

Die Rolle des Transkriptionsfaktors BATF3 in CD30⁺-Lymphomen und die genetische Charakterisierung von Kombinationslymphomen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Anna Lollies
aus Kevelaer

August 2017

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Perihan Nalbant

3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2017

Vermerk

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in der Fachzeitschrift Leukemia publiziert:

Lollies, A., Hartmann, S., Schneider, M., Bracht, T., Weiss, A.L, Arnolds, J., Klein-Hitpass, L., Sitek, B., Hansmann, M.L., Küppers, R., Weniger, M.A. (2017).

An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.

Leukemia, doi: 10.1038/leu.2017.203.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Rekombinationsprozesse während der frühen B-Zell-Entwicklung	1
1.2 Keimzentrumsreaktion	3
1.3 Pathogenese von B-Zell-Lymphomen.....	5
1.4 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).....	7
1.4.1 Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBL).....	7
1.4.2 Mantel-Zell-Lymphom (MZL)	7
1.4.3 Splenisches Marginal-Zonen-Lymphom (SMZL)	8
1.4.4 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	8
1.4.5 Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)	9
1.4.6 Kombinationslymphome	10
1.5 Hodgkin-Lymphom (HL)	10
1.5.1 Klassifizierung und Phänotyp des HL	10
1.5.2 Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen	12
1.5.3 Genetische Läsionen in HRS-Zellen.....	13
1.5.4 Die Rolle von EBV im HL	14
1.5.5 Deregulierte Signalwege im HL	15
1.5.6 Das Mikromilieu im cHL	15
1.6 Die Rolle der AP-1-Transkriptionsfaktoren in CD30 ⁺ -Lymphomen.....	16
1.6.1 Die AP-1-Transkriptionsfaktoren.....	16
1.6.2 Interaktion von AP-1 mit IRFs.....	18
1.6.3 Die Funktion von BATFs in den Zellen des Immunsystems	19
1.6.4 AP-1-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese von Lymphomen	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Materialien.....	23
2.1.1 Laborgeräte.....	23
2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	24

2.1.3	Verwendete Zelllinien	25
2.1.4	Oligonukleotide	25
2.1.5	TaqMan-Sonden	28
2.1.6	Antikörper.....	28
2.1.7	Restriktionsenzyme.....	30
2.1.8	Kits	30
2.1.9	Computersoftware und Statistik	31
2.2	Zellkulturtechniken	31
2.2.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	31
2.2.2	Zellzahlbestimmung	32
2.2.3	Durchflusszytometrie	32
2.2.4	Interleukin (IL)-Stimulation	32
2.2.5	Inhibitor-Versuche.....	33
2.2.6	Annexin V- und PI-Färbung	33
2.2.7	Caspase 3-Färbung	33
2.2.8	Proliferationsassay.....	34
2.2.9	MTS-Assay	34
2.3	Molekular- und mikrobiologische Methoden	35
2.3.1	Isolierung und Sortierung von humanen tonsillären B-Zell-Populationen	35
2.3.2	Färbung von Kombinationslymphomen	36
2.3.3	Mikrodissektion von Zellen mittels <i>Laser Microbeam Microdissection</i> (LMM).....	38
2.3.4	Exom-Sequenzierung von Kombinationslymphomen.....	38
2.3.5	IgV-Gen-PCR-Analysen von Kombinationslymphomen	39
2.3.6	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	42
2.3.7	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	42
2.3.8	Klonierungen	43
2.3.9	Genexpressionsanalysen (GEP)	46
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	46
2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	46
2.4.2	Herstellung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten	47
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
2.4.4	Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP)	47
2.4.5	Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)	48
2.4.6	Western-Blotting	49
2.5	Massenspektrometrie mittels LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie)	50
2.5.1	Probenvorbereitung und Trypsinverdau	50
2.5.2	Identifikation und Quantifizierung von Peptiden	51

2.6	Lentivirale Methoden.....	51
2.6.1	Produktion von Lentiviren in HEK 293T-Zellen.....	51
2.6.2	Bestimmung des lentiviralen Titers.....	52
2.6.3	Infektion von Zelllinien	52
3	Ergebnisse	54
3.1	BATF3 aus der AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie ist hoch exprimiert in CD30 ⁺ -Lymphomen 54	
3.2	Korrelation zwischen EBV-Status und BATF3-Expression in cHL.....	58
3.3	BATF3-Expression in humanen tonsillären B-Zell-Populationen.....	59
3.4	Ausprägung von AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren in humanen Lymphomen	61
3.5	Identifizierung von BATF3-Interaktionspartnern	63
3.6	Herunterregulation von BATF3 durch shRNA-vermittelten lentiviralen Gentransfer	67
3.7	Effekt auf das Wachstum von ALCL-, cHL- und PMBL-Zelllinien nach BATF3- Herunterregulation	69
3.7.1	Proliferationsanalyse in shBATF3-transduzierten cHL- und ALCL-Zelllinien	71
3.7.2	Analyse des Zelltods nach BATF3-Herunterregulation im cHL und ALCL	73
3.8	GEP von L-428 nach BATF3-Herunterregulation	77
3.8.1	Expression von BATF in cHL- und ALCL-Linien nach BATF3-Herunterregulation	80
3.8.2	Genset-Anreicherungsanalyse von shBATF3-transduzierten L-428-Zellen	82
3.9	MYC ist herunterreguliert nach Transduktion mit shBATF3	84
3.10	Überexpression von BATF3 kann die MYC-Ausprägung verstärken.....	88
3.11	MYC ist ein direktes Zielgen von BATF3	89
3.12	BATF3-Expression nach MYC-Herunterregulation	91
3.13	IRF4 hat keinen Einfluss auf die MYC-Expression in cHL-Zelllinien	93
3.14	CD30-Expression nach BATF3-Herunterregulation.....	95
3.15	BATF3-Expression wird vom JAK/STAT-Signalweg reguliert.....	97
3.15.1	IL-13-Stimulation führt zur verstärkten BATF3-Expression in cHL-Zelllinien	102
3.15.2	pSTATs binden an den <i>BATF3</i> -Promotor in cHL- und ALCL-Zelllinien	105
3.16	Genetische Charakterisierung von Kombinationslymphomen	108
3.16.1	IgV-Gen-Analysen zur Bestimmung der klonalen Verwandtschaft von Kombinationslymphomen	108

3.16.2	Exom-Sequenzierung von Kombinationslymphomen	114
3.16.3	Vorläufige Analyse genetischer Läsionen von Kombinationslymphomen.....	116
4	Diskussion	120
4.1	Rolle des AP-1-Transkriptionsfaktors BATF3 in der Pathogenese von CD30 ⁺ -Lymphomen 120	
4.1.1	Ausprägung und Interaktion von BATF3 mit AP-1- und IRF-Faktoren in CD30 ⁺ - Lymphozyten und Lymphomzellen.....	120
4.1.2	Assoziation von EBV-Status und BATF3-Expression.....	123
4.1.3	Essentielle Funktion von BATF3 im cHL, ALCL und PMBL	124
4.1.4	BATF3 und JUN regulieren die Expression von MYC	125
4.1.5	Der JAK/STAT-Signalweg reguliert BATF3 in CD30 ⁺ -Lymphomen	127
4.1.6	Zusammenhang zwischen CD30, MYC und BATFs in der Lymphompathogenese.....	129
4.2	Genetische Analyse von Kombinationslymphomen.....	130
4.2.1	Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von Kombinationslymphomen mittels IgV- Gen-Analysen.....	130
4.2.2	Vorläufige Analyse genetischer Läsionen in Kombinationslymphomen	135
5	Zusammenfassung	138
6	Literaturverzeichnis.....	140
7	Anhang.....	159
7.1	Tabellen.....	159
7.2	Danksagung	162
7.3	Publikationsliste	163
7.4	Lebenslauf.....	164
7.5	Eidesstattliche Erklärung.....	166

Abkürzungsverzeichnis

ABC-DLBCL	<i>in vitro</i> -aktiviertes B-Zell-ähnliches DLBCL
AICE	AP-1-IRF-Kombinationselemente (engl. <i>AP-1-IRF composite elements</i>)
AID	Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase
ALK	anaplastische Lymphom-Kinase
AP-1	Aktivator-Protein-1 (engl. <i>Activator protein-1</i>)
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC (Farbstoff)	Allophycocyanin
ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. <i>B-cell-receptor</i>)
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cDC	klassische dendritische Zelle (engl. <i>classical dendritic cell</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementarität-bestimmende Region (engl. <i>complementarity determining regions</i>)
CDS	kodierende DNA-Sequenz (engl. <i>coding DNA sequence</i>)
CH	konstante Region der schweren Ig-Kette
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-seq	Chromatin-Immunpräzipitation mit Sequenzierung
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom (engl. <i>classical Hodgkin Lymphoma</i>)
CLL	Chronische lymphozytische Leukämie
C-Region	konstante (engl. <i>constant</i>) Region der Ig-Ketten
CSR	Klassenwechselrekombination
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
DH	Diversitäts-Gensegment der schweren Ig-Kette
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
et al.	et altera (lat. und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FC	n-fache Änderung (engl. <i>Fold change</i>)
FCS	fötales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zelle (engl. <i>follicular dendritic cell</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregionen (engl. <i>framework regions</i>)
GC	Keimzentrum (engl. <i>germinal center</i>)
GCB-DLBCL	GC-B-Zell-ähnliches DLBCL (engl. <i>germinal center B-cell-like DLBCL</i>)
GEP	Genexpressionsprofil
GSEA	Genet-Anreicherungsanalyse (engl. <i>gene set enrichment analysis</i>)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin schwere Kette (engl. <i>heavy chain</i>)
IHC	Immunhistochemie

IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
JH	Verbindungs-Gensegment der schweren Kette
JL	Verbindungs-Gensegment der leichten Kette
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	leichte Kette (engl. <i>light</i>)
MACS	magnetische Zellseparation (engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MM	Multiples Myelom
MZL	Mantelzell-Lymphom
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
m/z	Masse-zu-Ladung (z= Ladungszahl eines Ions)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	noduläres Lymphozyten-prädominierendes Hodgkin-Lymphom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PMBL	primäres mediastinales B-Zell-Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit (engl. <i>real-time</i>) PCR
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenzen
RT	Reverse Transkription
sek	Sekunden
SHM	somatische Hypermutation
SNV	Einzelnukleotid-Varianten (engl. <i>single nucleotide variants, SNVs</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	engl. <i>Tris-buffered Saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren
VAF	Allelfrequenz der Variante (engl. <i>Variante Allele Frequency</i>)
VH	variable Region der schweren Ig-Kette
VL	variable Region der leichten Ig-Kette
WGA	Gesamtgenomamplifizierung (engl. <i>whole genome amplification</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BATF3-Expression in Lymphomen.....	55
Abbildung 2: BATF3 ist in cHL-, PMBL- und ALCL-Zelllinien stark ausgeprägt.	57
Abbildung 3: EBV-Status und BATF3-Expression im cHL.....	58
Abbildung 4: BATF3-Expression in humanen Lymphozyten.	61
Abbildung 5: Ausprägung von JUN und JUNB in cHL- und NHL-Linien.	62
Abbildung 6: Expression von IRFs in HL- und NHL-Linien.....	63
Abbildung 7: JUN und JUNB sind Interaktionspartner von BATF3.	66
Abbildung 8: IRF4 ist nicht im BATF3-Immunpräzipitat zu detektieren.....	67
Abbildung 9: Schematische Darstellung der shRNA-Bindestellen in der BATF3-mRNA.	67
Abbildung 10: Überprüfung der Herunterregulation von BATF3 durch vier spezifische shRNAs.	68
Abbildung 11: BATF3-Herunterregulation durch shRNA-vermittelte lentivirale Transduktion.	69
Abbildung 12: Kompetitives Wachstumsverhalten nach BATF3-Herunterregulation in Lymphom-Zelllinien.	71
Abbildung 13: Reduzierte Proliferation von cHL- und ALCL-Zelllinien nach shBATF3-Transduktion.	73
Abbildung 14: Verringertes Überleben von L-428, U-HO1 und SR-786 nach BATF3-Herunterregulation.....	74
Abbildung 15: Die Herunter-regulation von BATF3 führt zu einer Zunahme von apoptotischen cHL- und ALCL-Zellen.	75
Abbildung 16: Erhöhte Caspase 3-Aktivität nach Transduktion von shRNAs gegen BATF3 in cHL- und ALCL-Linien.	76

Abbildung 17: Genexpressionsprofile (GEP) von shBATF3-transduzierten L-428-Zellen.....	78
Abbildung 18: Validierung von BATF3-Zielgenen in cHL-Zelllinien.	80
Abbildung 19: BATF-Ausprägung in Lymphom-Zelllinien.....	82
Abbildung 20: Anreicherung von verschiedenen Gensets in sh4BATF3-transduzierten L-428 Zellen, die mit dem JAK/STAT-Signalweg verknüpft sind.	83
Abbildung 21: MYC-Herunterregulation in shBATF3-transduzierten L-428 und MYC-Proteinausprägung in HL-Linien.	85
Abbildung 22: Abnahme der MYC-Proteinlevel nach BATF3-Herunterregulation in cHL- und ALCL-Zelllinien.	86
Abbildung 23: Herunterregulation von BATF3- und MYC-Ausprägung in PMBL-Linien.....	87
Abbildung 24: Expression von BATF3 kann MYC-Proteinlevel in der U-HO1 cHL-Linie verstärken.	89
Abbildung 25: Schematischer Ausschnitt der genomischen Region von <i>MYC</i>	89
Abbildung 26: Bindung von BATF3 und JUN an eine AP-1-Erkennungssequenz im <i>MYC</i> -Promotor.	91
Abbildung 27: MYC-Herunterregulation und BATF3-Ausprägung in cHL- und ALCL-Linien..	93
Abbildung 28: IRF4-Herunterregulation führt zur Reduktion von MYC in ALCL- nicht aber in cHL-Zelllinien.	94
Abbildung 29: CD30-Ausprägung nach BATF3-Herunterregulation.	96
Abbildung 30: Messung der metabolischen Aktivität von cHL-Zelllinien nach Zugabe des JAK2-Inhibitors TG101348.	97
Abbildung 31. JAK2-Inhibition führt zur Herunterregulation von BATF3 in cHL- und PMBL-Linien.	100
Abbildung 32: JAK2-Inhibition in ALCL-Zelllinien.	101
Abbildung 33: IL-13-Stimulation führt zur verstärkten BATF3-Ausprägung in cHL-Linien....	104

Abbildung 34: IL-21-Stimulation zur Untersuchung der BATF3-Ausprägung in ALCL-Zelllinien.	105
Abbildung 35: STAT-Erkennungssequenzen im <i>BATF3</i> -Gen.....	105
Abbildung 36: pSTATs binden an verschiedene Erkennungsstellen im <i>BATF3</i> -Gen.....	107
Abbildung 37: Schematische Darstellung der umgelagerten IgV-Gene.....	109
Abbildung 38: Analyse der sortierten (Tumor)zellen des ersten Kombinationslymphoms. ..	109
Abbildung 39: IgV-Genumlagerungen von HRS- und CLL-Zellen des ersten Kombinationslymphoms.	111
Abbildung 40: IgV-Genumlagerungen von HRS- und SMZL-Zellen des zweiten Kombinationslymphoms.	112
Abbildung 41: IgV-Genumlagerungen von HRS- und MZL-Zellen des dritten Kombinationslymphoms.	113
Abbildung 42: Onkogene Wirkung und Regulation von BATF3 in CD30 ⁺ -Lymphomen.	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.	23
Tabelle 2: Liste aller verwendeten Nährmedien, Puffer und Lösungen.	24
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.	25
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 5: Liste aller verwendeten TaqMan-Sonden.	28
Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper.	28
Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper.	29
Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme.	30
Tabelle 9: Verwendete Kits.	30
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien für die erste Runde der IgV-Gen-PCR.	40
Tabelle 11: Das PCR-Programm für die erste Runde der IgV-Gen-PCR.	41
Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die zweite Runde der IgV-Gen-PCR.	41
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der zweiten Runden der IgV-Gen-PCR.	41
Tabelle 14: Sequenzreaktion zur Sequenzierung der shRNA nach Klonierung in den LeGO-Vektor.	45
Tabelle 15: PCR-Konditionen der Sequenzreaktion.	45
Tabelle 16: Übersicht der BATF3-gefärbten Lymphome mittels IHC.	59
Tabelle 17: Proteine, die im BATF3-Immunpräzipitat signifikant angereichert sind.	64
Tabelle 18: Die GSEA zeigt unterschiedlich angereicherte Gensets nach BATF3-Herunterregulation.	84
Tabelle 19: Zusammenfassung der IHC von BATF3, MYC und pSTAT3.	102

Tabelle 20: Allgemeine Statistik der Exom-Sequenzierung der untersuchten Kombinationslymphome.	115
Tabelle 21: Anzahl genetischer Läsionen der drei untersuchten Kombinationslymphome. .	117
Tabelle 22: Übersicht einiger ausgewählter Kandidatengene der drei Kombinationslymphome, die für Validierungsstudien in Betracht gezogen werden.....	119
Tabelle 23: Signifikant regulierte Gene in shBATF3-transduzierten L-428-Zellen.	159

1 Einleitung

Der Mensch besitzt zur Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen ein Immunsystem, das sich in das angeborene und erworbene (adaptive) Immunsystem einteilen lässt. Das angeborene Immunsystem dient der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern und wirkt unter anderem über Rezeptoren auf phagozytierenden Zellen, die konservierte Pathogenantigene erkennen. Das adaptive Immunsystem löst eine spezifische Immunantwort gegen das Pathogen aus. B- und T-Lymphozyten sind die wichtigsten Zellen des adaptiven Immunsystems und durch hoch spezialisierte Antigen-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet. T-Lymphozyten erkennen Antigene als prozessierte Peptide auf sogenannten MHC-Komplexen (engl. *major histocompatibility complex*) auf der Membranoberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (engl. *antigen-presenting cells*, APCs). Darüber hinaus kann die Erkennung des Antigens über den membranständigen B-Zell-Rezeptor (engl. *B-cell-receptor*, BCR) auf B-Lymphozyten erfolgen oder über die von ihnen sezernierten Antikörper. Die Immunantwort lässt sich noch weiter unterteilen in eine T-Zell-unabhängige und T-Zell-abhängige Immunantwort. Bei beiden Prozessen werden Antikörper von B-Zellen sezerniert, hingegen werden nur bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort langlebige Gedächtnis-B-Zellen und langlebige Antikörper-sezernierende Plasmazellen gebildet. Dysfunktionen in den Zellen des adaptiven Immunsystems können sich als Immundefizienzen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen äußern. Zudem birgt die Diversifikation von Antigen-Rezeptoren auf Lymphozyten einige Gefahren, die zu DNA-Schädigungen, wie zum Beispiel DNA-Doppelstrangbrüchen und chromosomalen Translokationen, führen können und die maligne Transformation von Lymphozyten begünstigen.

1.1 Rekombinationsprozesse während der frühen B-Zell-Entwicklung

Während der Embryonalentwicklung entstehen B-Lymphozyten in der fötalen Leber und später im Knochenmark des Menschen. Bis eine reife, naive B-Zelle entsteht muss zunächst ein funktioneller, nicht-autoreaktiver BCR ausgebildet werden. Dieser besteht aus zwei schweren (engl. *heavy*, H) und zwei leichten (engl. *light*, L)

Immunglobulin (Ig)-Ketten, die wiederum aus einer konstanten (engl. *constant*, C) und einer variablen (engl. *variable*, V) Region bestehen. Der Isotyp des Antikörpers wird von den C-Regionen der schweren Kette bestimmt und übt verschiedene Effektorfunktionen aus. Die C-Regionen werden von einem C μ -, einem C δ -, einem C ϵ -, einem der zwei C α - oder einem der vier C γ -Gene kodiert (Takahashi et al. 1982). Die spezifische Antigenerkennung erfolgt über die V-Region des BCRs und ist in drei hypervariable Regionen (engl. *complementarity determining regions*, CDR) und vier Gerüstregionen (engl. *framework regions*, FR) unterteilt. Die V-Region der schweren Ig-Kette (VH-Region) wird durch somatische Genumlagerungen von V-, Diversitäts (D)- und Verbindungs (J)-Segmenten gebildet. Im Menschen sind für die VH-Region etwa 40 V-Gensegmente, 23 D-Gensegmente und 6 J-Gensegmente zu finden, wovon jeweils eins für die Ausbildung der VH-Region benutzt wird (Corbett et al. 1997, Murphy et al. 2016). Die sogenannte VDJ-Rekombination wird von den beiden Lymphozyten-spezifischen Enzymen RAG1 und RAG2 (engl. *recombination-activating gene 1/2*) vollzogen (Oettinger et al. 1990, McBlane et al. 1995). Die V-, D- und J-Gensegmente sind an ihren 5'- und 3'-Enden durch Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) gekennzeichnet, welche von RAG1 und RAG2 erkannt und geschnitten werden (Gellert 2002). Bei der anschließenden Zusammenlagerung der V-, D- und J-Gensegmente kommt es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur, welche an einer variablen Position wieder geöffnet wird, wodurch es zu überhängenden Nukleotiden kommen kann. Diese werden durch komplementäre Basen wieder aufgefüllt, sodass palindromische Sequenzen (P-Nukleotide) entstehen, was zu einer Diversifikation des BCRs führt. Ebenso können Exonukleasen die Verbindungsstellen durch den Abbau von Basen weiter modifizieren und das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase kann weitere nicht-Keimbahn-kodierte Nukleotide, sogenannte N-Nukleotide, zwischen den Gensegmenten einfügen. Die Veränderungen der V-Region können zu einer Verschiebung des Leserasters führen und die Ausprägung eines funktionellen BCRs verhindern. In diesem Fall besteht die Möglichkeit der VDJ-Rekombination auf dem zweiten Allel der Zelle (Rajewsky 1996). Die anschließende Umlagerung der leichten Ig-Kette erfolgt fast identisch, allerdings fehlen bei der leichten Ig-Kette die D-Gensegmente. Die leichte Kette wird vom κ - oder λ -Lokus kodiert. War die VJ-Rekombination beider Allele des κ -Lokus nicht erfolgreich, erfolgt die Genumlagerung auf dem λ -Lokus (Gellert 2002). 40 funktionelle V κ - und 5 J κ -

Gensegmente sowie 30 funktionelle V λ - und 4 J λ -Gensegmente sind im menschlichen Genom zu finden. Da mehrere Kopien der V-, D- und J-Gensegmente vorliegen und bei der Rekombination der Gensegmente die Verbindungsstellen weiter modifiziert werden können, ergibt sich eine sehr hohe Kombinationsmöglichkeit von theoretisch etwa 10^{14} verschiedenen BCR, die ein Individuum generieren kann (Sanz 1991). Da jede B-Zelle einen einzigartigen BCR ausprägt, kann dieser als klonaler Marker einzelner B-Zell-Klone genutzt werden.

1.2 Keimzentrumsreaktion

Als Antwort auf Infektionen mit Pathogenen findet in Lymphfollikeln die Keimzentrums (engl. *germinal center*, GC)-Reaktion statt. Während der GC-Reaktion erfolgt die Affinitätsreifung des BCRs, was zu einer höheren Antikörpervielfalt und -affinität führt und für eine langanhaltende und effiziente Immunität sorgt (MacLennan 1994). Naive B-Zellen stoßen in der Peripherie auf ein passendes Antigen und wandern in sekundäre lymphatische Organe ein, wo sie dann in der T-Zell-reichen Zone auf T-Helferzellen (TH-Zellen) und APCs treffen. Die Interaktion mit Antigen-spezifischen TH-Zellen löst Proliferationssignale in den B-Zellen aus, sodass sich Keimzentren ausbilden können. Histologisch lässt sich das GC in eine dunkle Zone, in der massive Proliferation stattfindet und eine helle Zone einteilen, in der Selektionsprozesse stattfinden. In der dunklen Zone reifen die B-Zellen zu sogenannten Zentroblasten, die eine massive Expansion durchlaufen und deren IgV-Gene durch die somatische Hypermutation (SHM) weiter modifiziert werden (Berek et al. 1991, Jacob et al. 1991, Küppers et al. 1993, MacLennan 1994, Rajewsky 1996). Unter SHM ist ein genetischer Prozess zu verstehen, der zum Austausch einzelner Nukleotide führt aber auch Insertionen und Deletionen verursachen kann und in einem Bereich um etwa 2 Kilobasen (kb) stromabwärts von der Transkriptionsstartseite der IgV-Gene stattfindet. Die Mutationsrate der SHM liegt bei etwa 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen pro Basenpaar und Zellteilung (Kocks et al. 1989). Der Prozess der SHM betrifft nicht nur IgV-Gene sondern kann mit niedriger Frequenz auch in einigen Nicht-Ig-Genen von Post-GC- und GC-B-Zellen nachgewiesen werden (Shen et al. 1998, Pasqualucci et al. 2001). Somatisch mutierte Zentroblasten wandern als Zentrozyten in die helle Zone des GC ein und erfahren hier einen Selektionsprozess im Zusammenspiel mit follikulären dendritischen Zellen

(FDCs) und follikulären TH-Zellen. Zentrozyten erkennen unprozessierte Antigene auf den FDCs und präsentieren follikulären TH-Zellen über ihren MHC-II-Komplex das prozessierte Antigen. Zentrozyten mit hochaffinen BCR erhalten über die CD40/CD40L-Interaktion Überlebenssignale und werden positiv selektioniert (De Silva et al. 2015). Bei unzureichender Bindungsstärke erfährt die B-Zelle eine negative Selektion und wird durch Apoptose eliminiert. Abgestorbene B-Zellen werden im GC von spezialisierten Makrophagen phagozytiert (Smith et al. 1998). So ist das GC einerseits durch Proliferation der Zentroblasten aber auch durch massives Zellsterben gekennzeichnet. Beispielsweise können GC-B-Zellen *in vitro* nur durch anti-apoptotische Signale wie CD40-Stimulation überleben (Feuillard et al. 1995). Bei positiver Selektion tritt die Zelle meist erneut in die dunkle Zone des GC ein, um weitere Runden der Proliferation und SHM durchlaufen zu können und die Affinität des BCRs zu steigern (Kocks et al. 1988, Victora et al. 2010, Dominguez-Sola et al. 2012). Darüber hinaus kann noch eine Klassenwechselrekombination (engl. *class switch recombination*, CSR) der konstanten Region der Ig-Gene in der hellen Zone geschehen. CSR und SHM werden von dem Enzym AID (engl. *activation-induced cytidine deaminase*) initiiert (Revy et al. 2000, Nagaoka et al. 2002). Einerseits desaminiert AID bei der SHM Cytidinreste zu Uracil, wodurch verschiedene Reparaturmechanismen aktiviert werden, die einen Nukleotidaustausch verursachen können. Andererseits verursacht AID während des Klassenwechsels Doppelstrangbrüche in den sogenannten Switch-Bereichen, die zum Austausch der konstanten Regionen führen. Die C μ - und C δ -Regionen werden dann durch eine der vier C γ -Regionen, einer der beiden C α -Regionen oder die C ϵ -Region ersetzt. Am häufigsten findet CSR im GC statt, allerdings kann CSR ebenfalls in einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort außerhalb des GC stattfinden. Positiv selektionierte Zentrozyten können das GC verlassen und zu langlebigen Gedächtnis- oder Plasmazellen differenzieren (De Silva et al. 2015). Durch die GC-Reaktion entsteht ein immunologisches Gedächtnis, sodass bei erneuter Infektion das Pathogen schnell eliminiert werden kann.

Bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung des GC spielen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren in den B-Zellen eine wichtige, regulatorische Rolle. Ebenso ist die Induktion einiger Transkriptionsfaktoren in den GC-B-Zellen essentiell, damit diese das GC verlassen und Differenzierungsprozesse eingeleitet werden können. BCL6 gilt als der „GC-Masterregulator“ und kontrolliert ein ganzes Netzwerk von

Transkriptionsfaktoren, welches an der Formierung und Aufrechterhaltung des GC beteiligt ist und ist erstmals in der interfollikulären Zone in B-Zellen, die Kontakt mit einem Antigen und der entsprechenden T-Zelle hatten, zu detektieren (Basso et al. 2010). Interferon-regulierender Faktor (IRF)4 und IRF8 tragen dabei zur BCL6-Ausprägung bei (Lee et al. 2006, Ochiai et al. 2013). BCL6 gilt als transkriptioneller Repressor und inhibiert Gene, die für das Verlassen des GC und die weitere B-Zell-Differenzierung notwendig sind. So reprimiert BCL6 den *BLIMP1*-Promotor über die Inhibition der transkriptionellen Aktivität von AP-1 (engl. *Activator protein-1*)-Proteinen (Vasanwala et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der AP-1-Faktor FRA1 die Expression von BLIMP1 durch Bindung an den *BLIMP1*-Promotor reprimiert und so die Plasmazelldifferenzierung kontrolliert (Grötsch et al. 2014). MYC, IRF4 und NFκB sind weitere essentielle Faktoren, um ein GC ausbilden zu können (Basso et al. 2015). Alle drei Faktoren zeigen ein bimodales Expressionsmuster. MYC wird nach der Ausbildung des GC von BCL6 transkriptionell reprimiert und wird anschließend in einer kleinen Fraktion von Zentrozyten exprimiert, die für den Wiedereintritt in die dunkle Zone bestimmt sind (Calado et al. 2012, Dominguez-Sola et al. 2012). NFκB-Aktivität ist in Zentroblasten nicht nachweisbar, wird jedoch wieder in einem Teil der Zentrozyten in der hellen Zone induziert, was zur Ausprägung von IRF4 und Reprimierung von BCL6 beiträgt. Die IRF4-positiven GC-B-Zellen können sich dann auf das Verlassen des GC und die Differenzierung in Richtung Plasmazellen vorbereiten. BLIMP1 und XBP1 sind neben IRF4 und NFκB weitere essentielle Faktoren der Plasmazellentwicklung (Reimold et al. 2001, Shaffer et al. 2002, Basso et al. 2015).

1.3 Pathogenese von B-Zell-Lymphomen

Maligne Lymphome sind monoklonale Neoplasien, die von Lymphozyten stammen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt Lymphome in Hodgkin- (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) (Swerdlow et al. 2008). Etwa 95% aller Lymphome haben ihren Ursprung in B-Zellen und ein Großteil der B-Zell-Lymphome weist somatisch mutierte IgV-Gene auf, was auf einen GC- oder Post-GC-Ursprung hindeutet (Küppers et al. 1999, Stevenson et al. 2001, Basso et al. 2015). Die starke Proliferation der Zentroblasten in der dunklen Zone, die SHM in den IgV-Regionen des BCRs und die CSR dienen der Verbesserung der Antikörperantwort und der

Affinitätsreifung des BCRs, allerdings begünstigen diese drei physiologischen Prozesse die Anhäufung von genetischen Läsionen und fördern das Risiko der malignen Transformation von GC-B-Zellen. So werden während der extrem schnellen Proliferation der Zentroblasten im GC DNA-Schäden vermehrt toleriert, was durch den GC-Regulator BCL6 vermittelt wird. Dieser reprimiert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in der DNA-Schadigungsantwort (engl. *damage response*) eine wichtige Rolle spielen wie z.B. *TP53*, *ATM* oder *ATR* (Dent et al. 1997, Cattoretti et al. 2005, Basso et al. 2010). Des Weiteren können auch Nicht-Ig-Gene von SHM betroffen sein, so ist z.B. *BCL6* in normalen GC-B-Zellen somatisch mutiert (Pasqualucci et al. 1998). Als aberrante SHM werden Mutationen bezeichnet, die bisher ausschließlich in Nicht-Ig-Genen von Tumorzellen gefunden wurden wie z.B. *PIM1* oder *RHOA* (Pasqualucci et al. 2001). Aufgrund der Lokalisation der somatisch mutierten Sequenzen stromabwärts der Transkriptionsstartseite sind potenziell regulatorische Sequenzen betroffen, in denen die SHM zur Deregulation der Genexpression beitragen kann. Chromosomale Translokationen als Folge einer fehlerhaften V(D)J-Rekombination, CSR oder SHM sind weitere genetische Läsionen, die charakteristisch für B-Zell-Lymphome sind (Basso et al. 2015). In der Regel sind in B-Zell-NHL (B-NHL) Translokationen zu finden die Onkogene unter Kontrolle von Promotoren oder *Enhancer* des aktiven Ig-Lokus positionieren, was eine deregulierte Expression des Onkogens zur Folge hat (Küppers et al. 2001a). Beispielsweise tritt beim Mantel-Zell-Lymphom (MZL) eine Ig-assoziierte *CCND1*-Translokation auf, die den *CCND1*-Lokus mit einem Teil des IgH-Lokus verbindet (Welzel et al. 2001). Beim Burkitt-Lymphom (BL) ist in fast 100% der Fälle eine Ig-*MYC*-Translokation zu detektieren (Taub et al. 1982, Battey et al. 1983). Eine *BCL2*-Translokation, bei der *BCL2* mit einem DHJH-Gensegment des IgH-Lokus verknüpft wird, ist charakteristisch für das folliculäre Lymphom (FL) und hier in etwa 80% aller Fälle auffindbar (Küppers 2005). Folge dieser Translokationen ist ein Verlust der Regulierbarkeit dieser Gene sowie eine verstärkte Ausprägung ihrer Genprodukte (Basso et al. 2015). Ein weiteres wichtiges Merkmal von B-Zell-Lymphomen sind Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen. Beispielsweise ist der NFκB-Inhibitor *TNFAIP3* in 30% aller *in vitro*-aktivierten B-Zell-ähnlichen (ABC)-DLBCL und in 40% aller klassischen HL (engl. *classical Hodgkin-Lymphoma*, cHL)-Fälle mutiert, was zu einer funktionellen Inaktivierung von TNFAIP3 (A20) führt und zur konstitutiven NFκB-Aktivität beiträgt (Compagno et al. 2009, Schmitz et al. 2009).

1.4 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Die NHL gehören zu den malignen Lymphomen und werden anhand ihrer genetischen, phänotypischen und klinischen Merkmale in verschiedene Formen unterschieden. Diese werden gemäß ihrer Abstammung den Natürlichen Killerzellen (NK)-, T-Zellen oder B-Zellen zugeordnet. Der Großteil der NHL stammt von entarteten B-Zellen ab, während T-Zell-Lymphome nur etwa 10% aller NHL ausmachen. BL, FL und diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) stammen von GC-B-Zellen ab und machen mit ungefähr 80% den Großteil aller B-NHL aus. Das MZL ist mit etwa 6% eines der selteneren B-NHL, ebenso wie das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL), welches nur etwa 2-4% der B-NHL ausmacht. Unter den T-Zell-Lymphomen bilden periphere T-Zell-Lymphome die größte Gruppe der T-Zell-NHL. Zu ihnen zählt auch das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) (Swerdlow et al. 2008).

1.4.1 Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBL)

Das PMBL zählt zu den aggressiven Lymphomen und tritt vermehrt bei jungen Erwachsenen auf, wobei es häufiger Frauen als Männer betrifft (Swerdlow et al. 2008). Thymische B-Lymphozyten gelten als Ursprungs-Zellen des PMBLs (Isaacson et al. 1987, Möller et al. 1989). Phänotypisch exprimieren PMBL-Zellen typische B-Zell-Marker wie CD20, CD40, CD79a, CD45, CD19 und CD22. Allerdings fehlt die Expression des BCRs auf der Zelloberfläche (Möller et al. 1986, Barth et al. 2002). Die B-Zell-Transkriptionsfaktoren PAX5, OCT2 und BOB1 sind außerdem ausgeprägt. Die Tumorzellen sind meist mittelgroß mit runden und häufig pleomorphen Zellkernen und eingebettet in ein diffuses, oftmals sklerosierendes Gewebe. Auch wenn HL und PMBL zwei verschiedene Lymphomentitäten darstellen sind die Genexpressionsprofile (GEP) beider Lymphome sehr ähnlich (Rosenwald et al. 2003, Savage et al. 2003). Außerdem prägen beide Lymphome CD30 auf ihrer Oberfläche aus.

1.4.2 Mantel-Zell-Lymphom (MZL)

Das MZL stammt von B-Zellen der Mantelzone ab, die das GC in sekundären lymphatischen Follikeln umgibt. Dieses eher selten vorkommende Lymphom ist in

rund 90% aller Fälle durch die t(11;14)-Translokation gekennzeichnet, was zu einer CCND1-Überexpression führt (Li et al. 1999, Jares et al. 2012). Zytologisch wird das MZL in eine blastoide und eine klassische Variante eingeteilt. MZL-Zellen exprimieren CD5, CD20 und CD43, die GC-Marker CD10 und BCL6 werden nicht ausgeprägt (Jares et al. 2012). Studien haben eine starke Ausprägung von SOX11 unabhängig vom CCND1-Status gezeigt und SOX11 als Onkogen im MZL charakterisiert (Ek et al. 2008, Navarro et al. 2012, Vegliante et al. 2013, Narurkar et al. 2016). Des Weiteren lassen sich etwa in der Hälfte der Fälle Mutationen und Deletionen in dem Tumorsuppressor ATM feststellen (Schaffner et al. 2000). Eine umfangreiche IgV-Gen-Analyse konnte zeigen, dass 15-40% der MZL somatisch mutierte IgV-Gene besitzen (Hadzidimitriou et al. 2011).

1.4.3 Splenisches Marginal-Zonen-Lymphom (SMZL)

Das SMZL stammt vermutlich von B-Lymphozyten der Marginal-Zone (MZ) ab, welche die Mantelzone eines GC umgibt. In der Milz umschließt die MZ die weiße Pulpa und grenzt diese von der roten Pulpa ab. Das SMZL zählt zu den indolenten (niedrigmalignen) Lymphomen mit einer medianen Überlebenszeit von 8-10 Jahren und macht nur etwa 1% aller Lymphome aus (Arcaini et al. 2016). Typischerweise sind B-Zell-Marker wie CD20, CD79a und IgM zu detektieren (Swerdlow et al. 2008). Chromosomale Translokationen sind im SMZL in der Regel nicht zu finden und als wichtigste genetische Läsionen gelten Mutationen in NOTCH- und NFκB-Signalmolekülen. So ist NOTCH2 in rund 10-25% der Fälle mutiert (Kiel et al. 2012). Inaktivierende Mutationen in *IKBKB* sind in etwa 10% der SMZL zu finden (Novak et al. 2009, Rinaldi et al. 2010, Rossi et al. 2011, Kiel et al. 2012). Ein weiteres Merkmal des SMZL sind stereotype BCRs, was darauf hindeutet, dass bestimmte Antigene eine Rolle bei der SMZL-Pathogenese spielen (Zibellini et al. 2010). In 10% der SMZL ist eine Genumlagerung des *IGHV1-2*-Segmentes der schweren Kette zu detektieren (Zibellini et al. 2010).

1.4.4 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL gehört zu den häufigsten Leukämien bei Erwachsenen mit einer Inzidenz von 1 Fall pro 100.000 Menschen/Jahr. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose liegt zwischen 67 und 72 Jahren und betrifft häufiger Männer als Frauen (Swerdlow

et al. 2008). Anhand ihrer IgV-Gene lässt sich die CLL in eine mutierte und eine unmutierte Form einteilen, wobei letztere einen aggressiveren klinischen Verlauf zeigt (Damle et al. 1999). Charakteristische genetische Läsionen sind Mutationen in *SF3B1*, *TP53* und *ATM* sowie Deletionen in 13q, 11q und 17p (Gaidano et al. 1991, Döhner et al. 2000, Quesada et al. 2011, Quesada et al. 2013). CLL-Zellen lassen sich anhand ihrer CD5-, CD23- und CD19-Expression identifizieren. Ein Großteil der CLL-Zellen exprimiert außerdem CD200, was die häufig recht schwierige Unterscheidung vom MZL erleichtern kann (Kretz-Rommel et al. 2008, Palumbo et al. 2009). Ein weiteres Merkmal der CLL sind stereotype BCRs in etwa 20% aller Fälle, was für eine pathologische Relevanz von bestimmten Antigenen spricht (Stamatopoulos et al. 2007).

1.4.5 Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)

Das ALCL ist ein CD30-positives, peripheres T-Zell-Lymphom, welches vor allen bei Kindern und Jugendlichen auftritt und etwa 15% aller pädiatrischen NHL ausmacht (Swerdlow et al. 2008). Charakteristisch für das ALCL ist neben der starken CD30-Ausprägung die NPM-ALK (Nucleophosmin-anaplastische Lymphom Kinase)-Translokation in etwa 50-60% der Fälle (Gascoyne et al. 1999, Suzuki et al. 2000). So lässt sich das ALCL in eine ALK⁺-Gruppe und eine ALK⁻-Gruppe einteilen, welche auch als systemisches ALCL zusammengefasst werden. Neben dem systemischen ALCL gibt es noch das kutane ALCL mit sehr ähnlichen Charakteristiken. Hinsichtlich des klinischen Verlaufs ist die Prognose bei ALK⁺-ALCL Patienten besser als bei ALK⁻-Patienten. Allgemein gilt das ALK⁺-ALCL als relativ gut therapierbar mit 5-Jahres-Überlebensraten von 70-86%, wohingegen beim ALK⁻-ALCL nur 5-Jahres-Überlebensraten von 30-49% erzielt werden (Savage et al. 2008). Morphologisch ist das ALCL durch große Tumorzellen gekennzeichnet, deren Zellkerne auffällig groß sind und prominente Nukleolen besitzen (Swerdlow et al. 2008). Ein Merkmal des ALCLs ist der stark aktive JAK/STAT-Signalweg, der durch konstitutiv aktives STAT3 aufrechterhalten wird. So sind verschiedene genetische Läsionen in *JAK1* und *STAT3* im ALK⁻-ALCL auffindbar, die zu hyperaktivem STAT3 führen (Crescenzo et al. 2015). In ALK⁺-ALCL kann ALK die aberrante Aktivität von STAT3 auslösen (Chiarle et al. 2005).

1.4.6 Kombinationslymphome

In seltenen Fällen treten zwei unterschiedliche Lymphome, sogenannte Kombinationslymphome, in einem Patienten auf. Kombinationslymphome sind häufig im selben Organ lokalisiert, treten gleichzeitig auf und machen etwa 1-4% aller Lymphome aus (Küppers et al. 2014). Häufig sind Kombinationen von einem NHL und einem HL zu finden, allerdings gibt es auch Kombinationslymphome, die aus zwei NHL bestehen (Jaffe et al. 1994). IgV-Gen-Analysen konnten zeigen, dass etwa 40-60% der untersuchten Kombinationslymphome klonal verwandt sind und aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, oftmals einer GC-B-Zelle, hervorgehen (Küppers et al. 2014). Da Kombinationslymphome gemeinsame sowie separate genetische Läsionen besitzen können, stellen sie einzigartige Modelle dar, um die Pathogenese von Lymphomen zu untersuchen und besser zu verstehen (Bräuninger et al. 1999, Küppers et al. 2001b, van den Berg et al. 2002, Tinguely et al. 2003, Rosenquist et al. 2004b, Schmitz et al. 2005).

1.5 Hodgkin-Lymphom (HL)

Das HL wurde erstmals im Jahr 1832 von dem Arzt Thomas Hodgkin beschrieben. Ein wichtiges Merkmal des HLs sind die mononukleären Hodgkin- und multinukleären Reed-Sternberg-Zellen (Sternberg 1898, Reed 1902), wobei letztere auffällig groß sind und auch als Riesenzellen beschrieben werden. Die Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen machen nur etwa 1% der Tumormasse aus, der Rest des Tumorgewebes ist ein gemischtes Infiltrat von verschiedenen Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs. Mit einer Inzidenz von etwa 3 Fällen pro 100.000 Menschen/Jahr ist das HL eines der häufigsten Lymphome in der westlichen Welt (Mathas et al. 2016). Das HL trifft vor allem junge Erwachsene zwischen 25 und 30 Jahren und tritt erneut vermehrt bei älteren Menschen ab 60 Jahren auf. Das HL gilt als sehr gut therapierbar. So werden heutzutage Remissionen in rund 80-90% der Betroffenen erzielt (Engert 2015, Mathas et al. 2016).

1.5.1 Klassifizierung und Phänotyp des HL

Anhand histologischer, morphologischer und immunphänotypischer Unterschiede lässt sich das HL in das cHL und das noduläre Lymphozyten-prädominante HL

(NLPHL) unterteilen. Das cHL macht mit rund 95% der Fälle den größten Teil aller HL aus. Im NLPHL sind die Tumorzellen als Lymphozyten-prädominante (LP)-Zellen bekannt, die im Vergleich zu den HRS-Zellen kleiner sind und gefaltete Zellkerne aufweisen (Marafioti et al. 1997). Das zelluläre Infiltrat beim NLPHL wird von B-Lymphozyten und CD57⁺-TH-Zellen dominiert (Boudova et al. 2003). Die wichtigsten Kriterien zur Unterscheidung von cHL und NLPHL sind die Expression von typischen B-Zell-Markern, wie z.B. OCT2, BOB1, BCL6 und CD20, der LP-Zellen, wohingegen die HRS-Zellen die Ausprägung typischer GC-B-Zell-Marker größtenteils verloren haben, dafür aber CD30 und oftmals auch CD15 auf ihrer Oberfläche ausprägen (Carbone et al. 1998, Greiner et al. 2005, Swerdlow et al. 2008). Das cHL wird von der WHO in vier weitere Untergruppen eingeteilt: Das nodulär-sklerosierende cHL, das etwa 70% der cHL-Fälle ausmacht, das gemischt-zellige cHL, das in 15-20% aller cHL auftritt, das Lymphozyten-reiche cHL, das in rund 5% der cHL-Fälle vorkommt, und das sehr selten auftretende Lymphozyten-arme cHL (Swerdlow et al. 2008). Das nodulär-sklerosierende cHL ist durch Kollagenfasern gekennzeichnet, die sich durch das Tumorgewebe ziehen. Das Infiltrat besteht neben kleineren Lymphozyten aus Histiozyten und Eosinophilen. Wie der Name erkennen lässt, sind im Mikromilieu des gemischt-zelligen cHL unterschiedliche Zellen des Immunsystems zu finden, wie z.B. Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile. Die HRS-Zellen im gemischt-zelligen cHL sind häufiger mit Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert als die HRS-Zellen der anderen Subtypen. Im Lymphozyten-reichen cHL sind gehäuft B-Zellen anzutreffen und die HRS-Zellen besitzen in ihrer Morphologie eine gewisse Ähnlichkeit zu den LP-Zellen. Beim Lymphozyten-armen cHL sind vermehrt HRS-Zellen und kaum Lymphozyten auffindbar (Mathas et al. 2016).

Im Gegensatz zu den Tumorzellen der NHL sind in den HRS-Zellen des cHLs typische B-Zell-Marker herunterreguliert (Kuzu et al. 1993, Watanabe et al. 2000, Re et al. 2001, Stein et al. 2001, Schwering et al. 2003b). Daher wird von den HRS-Zellen des cHLs auch von einem Verlust des B-Zell-Phänotyps gesprochen. Dieser Verlust ist unter anderem auf eine fehlende oder nur sehr schwache Ausprägung B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. OCT2, BOB1, PU-1 und EBF1, zurückzuführen (Stein et al. 2001, Torlakovic et al. 2001, Overbeck et al. 2012, Bohle et al. 2013). Beispielsweise gilt EBF1 als einer der Schlüsselregulatoren des B-Zell-Differenzierungsprogrammes und supprimiert im Mausmodell die Expression T-Zell-spezifischer Gene (Pongubala et al. 2008). Darüber hinaus konnte IRF5 als ein

weiterer Faktor identifiziert werden, der die Ausprägung B-Zell-spezifischer Faktoren verhindert (Kreher et al. 2014). DNA-Methylierungen von B-Zell-spezifischen Promotoren können ebenfalls zum Verlust des B-Zell-Phänotyps von HRS-Zellen beitragen (Doerr et al. 2005, Ushmorov et al. 2006, Ammerpohl et al. 2012). Einige der wenigen Gemeinsamkeiten zwischen B-Zellen und HRS-Zellen sind die Expression von CD40, CD80 und MHC-II-Molekülen, welche bei der Interaktion mit TH-Zellen eine Rolle spielen (Küppers 2009).

1.5.2 Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen

Der ungewöhnliche Phänotyp sowie das seltene Vorkommen der HRS-Zellen im Tumorgewebe, erschwerten es für eine lange Zeit den Ursprung der HRS-Zellen aufzuklären. Mit Hilfe der Mikrodissektion einzelner HRS-Zellen und der Etablierung der IgV-Gen-PCR (Polymerase-Kettenreaktion, engl. *polymerase chain reaction*), konnte gezeigt werden, dass fast alle HRS-Zellen umgelagerte, somatisch mutierte IgV-Gene besitzen (Küppers et al. 1994, Kanzler et al. 1996b). In etwa 25% der cHL-Fälle konnten destruktive somatische Mutationen der IgV-Gene in den HRS-Zellen gefunden werden, die eine Ausprägung der BCRs verhindern und normalerweise im GC zur Apoptose der Zelle führen (Kanzler et al. 1996b, Küppers et al. 1998). Aus diesen Gründen wird angenommen, dass HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen stammen, die durch weitere transformierende Ereignisse der Apoptose entkommen sind (Küppers et al. 2012). Ein weiteres Indiz dafür, dass HRS-Zellen von GC-B-Zellen abstammen, kommt von Kombinationslymphomen, bestehend aus einem cHL und einem NHL, die oftmals klonal verwandt sind und somatisch mutierte IgV-Gene mit gemeinsamen als auch separaten Mutationen tragen (Bräuninger et al. 1999). In seltenen Fällen können HRS-Zellen auch von T-Zellen abstammen wie durch die Identifizierung umgelagerter TCR-Gene und der Expression T-Zell-spezifischer Marker gezeigt werden konnte (Müschen et al. 2000, Seitz et al. 2000). Nichtsdestotrotz wird diskutiert, ob diese seltenen cHL-Fälle mit T-Zell-Ursprung als T-Zell-Lymphome einzuordnen sind, die den Phänotyp des cHLs nachahmen (Barry et al. 2003, Willenbrock et al. 2006).

1.5.3 Genetische Läsionen in HRS-Zellen

Das cHL zeigt eine Vielzahl an strukturellen chromosomalen Aberrationen und weist eine starke genetische Instabilität auf (Weber-Matthiesen et al. 1995, Falzetti et al. 1999). Die Ursachen für die starke genetische Instabilität im cHL sind noch immer nicht vollkommen verstanden. Ein möglicher Grund für die genetischen Instabilität könnte ein Fehler in der Schwesterchromatid-Kohäsion bei HRS-Zellen sein (Falzetti et al. 1999, Stevens et al. 2011). Etwa 20% der cHL-Fälle zeigen Translokationen im Ig-Lokus der HRS-Zellen. Allerdings konnten nur in wenigen Fällen die Translokationspartner ausfindig gemacht werden, wie z.B. *BCL2*, *REL* oder *MYC*, die pathogenetische Rolle der meisten Translokationen ist immer noch unklar (Martin-Subero et al. 2004, Martin-Subero et al. 2006). In 15% der cHL sind Translokationen im MHC-II-Transaktivator-(*CIITA*)-Gen zu detektieren, was eine verminderte Ausprägung von MHC-II auf den HRS-Zellen zur Folge hat und zur Immunevasion, dem Entkommen der Tumorzellen vor den Abwehrmechanismen des Immunsystems, führt (Steidl et al. 2011). In einer Exom-Sequenzierung von cHL-Fällen konnten inaktivierende Mutationen in *B2M*, einer Untereinheit des MHC-I-Komplexes, in den HRS-Zellen gefunden werden, die ebenfalls zur Immunevasion der HRS-Zellen beitragen (Reichel et al. 2015). Eine Vielzahl genetischer Läsionen ist bei Mitgliedern des NFκB-Signalweges zu detektieren. 10-15% der cHL-Fälle weisen inaktivierende Mutationen in *NFKBIA*, einem Inhibitor des kanonischen NFκB-Signalwegs, auf (Jungnickel et al. 2000, Lake et al. 2009) und 40% der cHL-Fälle besitzen inaktivierende Mutationen in *TNFAIP3*, einem weiteren NFκB-Inhibitor (Schmitz et al. 2009). In den HRS-Zellen ist eine verstärkte Ausprägung des NFκB-Faktors REL durch genomische Zugewinne und Amplifikationen in rund 50% aller cHL-Fälle zu beobachten (Küppers 2012). Weitere chromosomale Amplifikationen betreffen Region 9p24, auf der *JAK2*, *JMJD2C*, *PDL1* und *PDL2* lokalisiert sind (Joos et al. 2000, Green et al. 2010). Die starke Ausprägung von PDL1 und PDL2 auf den HRS-Zellen sorgt für eine Abschwächung der T-Zell-vermittelten Antitumorantwort und trägt dazu bei, dass HRS-Zellen der „Immunsurveillance“, der Erkennung und Eliminierung durch Immunzellen, entkommen können (Green et al. 2010, Rui et al. 2010, Ansell et al. 2015). JAK2 ist nicht nur wichtiges Mitglied des JAK/STAT-Signalweges, sondern kann auch Histon H3 modifizieren und so Einfluss auf die epigenetische Regulation des cHLs ausüben (Rui et al. 2010). Neben der verstärkten

Expression von JAK2 sind ebenfalls weitere genetische Läsionen im JAK/STAT-Signalweg zu finden. In rund 40% der cHL-Fälle sind inaktivierende Mutationen im *SOCS1*-Gen in den HRS-Zellen zu finden (Weniger et al. 2006). Mutationen, die die Phosphatase-Aktivität von PTPN1 in den HRS-Zellen reduzieren, sind in ca. 20% der cHL-Fälle zu finden (Gunawardana et al. 2014).

1.5.4 Die Rolle von EBV im HL

In rund 30-40% der cHL-Fälle in Europa und Nordamerika liegt eine Infektion der Lymphomzellen mit EBV, einem γ -Herpesvirus vor (Mathas et al. 2016). EBV-positive HRS-Zellen prägen EBV-Gene vom Latenz-Typ-II aus, was anhand der Expression von drei viralen Proteinen EBNA1, LMP1 und LMP2A und zwei Gruppen nicht-kodierender RNAs (EBERs und BARTs) erkennbar ist (Küppers 2009). LMP1 ist als Onkogen charakterisiert und die Überexpression führt in Mäusen zu B-Zell-Lymphomen (Kulwichit et al. 1998). Die Funktion von LMP1 entspricht einem aktivierten CD40-Rezeptor und führt zur Aktivierung von NF κ B, JAK/STAT, AP-1, p38 und PI3K (Mosialos et al. 1995, Kilger et al. 1998, Kulwichit et al. 1998, Young et al. 2003). LMP2A kann die Rolle des BCRs ersetzen, da B-Vorläuferzellen, die LMP2A aber keinen BCR ausprägen, überleben können (Caldwell et al. 1998). EBNA1 dient der Replikation des Virusgenoms und kann in HRS-Zellen CCL20 hochregulieren, um regulatorische T-Zellen anzulocken (Baumforth et al. 2008). Die pathogenetische Rolle von EBV im cHL wird durch Studien bekräftigt, die veranschaulichen, dass EBV *in vitro* GC-B-Zellen mit nicht-funktionellen BCR retten kann (Mancao et al. 2005). Dass das EBV die pathogenetische Funktion von verschiedenen deregulierten Rezeptor-Tyrosinkinasen übernehmen kann, wird durch die inverse Korrelation zwischen der Ausprägung von EBV und verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen bekräftigt (Renné et al. 2007). Darüber hinaus ist ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen Mutationen in *TNFAIP3* und EBV-Infektion im cHL festzustellen (Schmitz et al. 2009). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass eine Infektion mit EBV die pathogenetische Funktion verschiedener, im cHL typischerweise deregulierter, Signalwege übernehmen kann.

1.5.5 Deregulierte Signalwege im HL

Die häufigsten genetischen Läsionen im cHL betreffen Mitglieder der NF κ B- und JAK/STAT-Signalwege. Beide Signalwege sind in den HRS-Zellen des cHLs konstitutiv aktiv und essentiell für das Überleben der Zellen (Hinz et al. 2001, Kube et al. 2001, Martin-Subero et al. 2002, Skinnider et al. 2002a, Baus et al. 2006). Neben den beschriebenen genetischen Läsionen sind außerdem autokrine und/ oder parakrine Signalkaskaden für die konstitutive Aktivität von JAK/STAT- und NF κ B-Signalwegen verantwortlich. So aktivieren beispielsweise Interleukin (IL)-13 und IL-13-Rezeptor, welche beide von HRS-Zellen ausgeprägt werden, STAT6 im Zellinneren (Kapp et al. 1999). Gleiches gilt für die Ko-Expression von IL-21 und IL-21-Rezeptor auf HRS-Zellen, welche zur Aktivierung von STAT5A, STAT5B und STAT3 führt (Lamprecht et al. 2008, Scheeren et al. 2008). Mitglieder der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Familie, wie z.B. CD40, CD30, TACI, BCMA und RANK, werden von HRS-Zellen ausgeprägt und tragen ebenfalls zu einer konstitutiven NF κ B-Aktivität bei. CD40 interagiert mit CD40L auf T-Zellen, die in unmittelbarer Umgebung zu HRS-Zellen liegen (Carbone et al. 1995). Aktives NF κ B kann zudem zu verstärktem STAT5A und STAT5B in den HRS-Zellen beitragen (Hinz et al. 2002). Neben diesen beiden Signalwegen sind noch eine Reihe weiterer Signalwege dereguliert und konstitutiv aktiv in den Tumorzellen des cHLs. Der PI3K-AKT-Signalweg wird in HRS-Zellen über Rezeptor-Tyrosinkinasen, CD30, CD40 und RANK aktiviert (Küppers 2009). Studien haben gezeigt, dass cHL-Zelllinien bei einer Inhibition von AKT sterben (Georgakis et al. 2006). Die deregulierte Aktivität von AP-1-Faktoren spielt eine weitere entscheidende Rolle in der Pathogenese des cHLs und wird in Abschnitt 1.6 näher erläutert. Studien von Watanabe und seinen Kollegen haben außerdem gezeigt, dass der AP-1-Faktor JUNB die Ausprägung von CD30 in HRS-Zellen regulieren kann (Watanabe et al. 2003, Watanabe et al. 2005).

1.5.6 Das Mikromilieu im cHL

Das cHL ist durch einen sehr geringen Tumorzellanteil von nur etwa 1% und ein inflammatorisches Infiltrat verschiedenster Immunzellen gekennzeichnet. Einen großen Anteil des Tumorgewebes machen CD4⁺-T-Zellen aus, die die HRS-Zellen mit Überlebenssignalen versorgen (Wein et al. 2016). So interagieren CD4⁺-T-Zellen

über ihren CD40L mit CD40 auf den HRS-Zellen und regulatorische CD4⁺-T-Zellen werden von den HRS-Zellen durch CCL5, CCL17 und CCL22 angelockt, wo sie wiederum durch die Ausschüttung von IL-10 zytotoxische CD8⁺-T-Zellen hemmen können (Wein et al. 2016). Durch die Ausschüttung verschiedenster Boten- und Lockstoffe rekrutieren HRS-Zellen andere Immunzellen und bauen sich so ein passendes Mikromilieu auf. IL-5, GM-CSF, CCL5 und CCL28 werden von den HRS-Zellen sekretiert und führen zur Anlockung von Eosinophilen. Makrophagen und Mastzellen werden ebenfalls durch Ausschüttung von CCL5 und Neutrophile durch IL-8 angelockt (Skinnider et al. 2002b, Fischer et al. 2003, Hanamoto et al. 2004, Aldinucci et al. 2008). Um zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen zu entkommen, exprimieren HRS-Zellen IL-10, TGF- β , Galectin-1 und PDL1, welches beispielsweise durch Bindung an PD1 Effektor-T-Zellen inhibieren kann. Das Mikromilieu ist essentiell für das Überleben der HRS-Zellen, was daran erkennbar ist, dass HRS-Zellen sehr schlecht zu kultivieren sind und in immundefizienten Mäusen nicht überlebensfähig sind (Kapp et al. 1993, Meggetto et al. 1996). Außerdem sind HRS-Zellen nur selten im peripheren Blut zu finden und sind auch bei Metastasierung in nicht-lymphatische Organe vom typischen Mikromilieu umgeben (Küppers 2009).

1.6 Die Rolle der AP-1-Transkriptionsfaktoren in CD30⁺-Lymphomen

Obwohl cHL, ALCL und PMBL zu verschiedenen Lymphomentitäten zählen, ist eine wichtige Gemeinsamkeit neben der Ausprägung von CD30⁺ und konstitutiv aktiven JAK/STAT die starke Ausprägung von AP-1. AP-1-Transkriptionsfaktoren regulieren verschiedenste zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Überleben, spielen allerdings auch in der Pathogenese von verschiedenen Tumoren eine Rolle (Eferl et al. 2003, Shaulian 2010).

1.6.1 Die AP-1-Transkriptionsfaktoren

AP-1-Transkriptionsfaktoren fungieren als Homo- oder Heterodimere und bestehen aus JUN (JUNB, JUN, JUND)-, FOS (FOS, FOSB, FRA1, FRA2)- und ATF (BATF, BATF2, BATF3, ATF, ATF3)-Familienmitgliedern, welche zur Gruppe der bZIP (engl. *basic leucine zipper*)-Proteine gehören (Eferl et al. 2003). Allen AP-1-Faktoren gemeinsam ist die Erkennung von TRE-Sequenzen (engl. 12-O-

Tetradecanoylphorbol-13-acetate DNA response element), die aus der Basenfolge TGA(G/C)TCA (5'-3' Richtung) bestehen (Angel et al. 1987). Die bZIP-Domäne dient der Dimerisierung mit anderen Proteinen und ist charakteristisch für viele DNA-bindende Proteine. Die Regulation von AP-1 kann posttranslational über Phosphorylierung durch Mitglieder der MAPK-Familie erfolgen. ERK, JNK und p38 gehören zur MAPK-Familie und werden über verschiedene Stimuli, wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, aktiviert (Zhang et al. 2002, Papoudou-Bai et al. 2016b). Aktiviertes ERK, JNK und p38 kann dann AP-1-Faktoren durch Phosphorylierung aktivieren. Inwiefern AP-1 über das Zellschicksal entscheidet, hängt vor allem auch von der Zusammensetzung der AP-1-Dimere, dem generellen Vorhandensein von AP-1 und dem zellulären Kontext ab (Shaulian 2010). Im Allgemeinen fördert beispielsweise JUN die Zellproliferation durch Induktion von CCND1 und Hemmung von p16 und p21 (Shaulian et al. 2001, Shaulian 2010). JUNB kann einerseits Zellproliferation durch die Hemmung von CCND1 und die Induktion von p16 unterdrücken, andererseits aber auch die Zellteilung durch Induktion von CCNA2 fördern (Szremska et al. 2003). Das Expressionsmuster der AP-1-Faktoren ist in lymphatischen Geweben sehr divers. So sind JUN und JUNB in einigen wenigen Lymphozyten im GC und reaktiven Tonsillen ausgeprägt. FOS, FRA1 und ATF3 sind dagegen in reaktiven Lymphknoten nicht oder kaum zu detektieren (Mathas et al. 2002, Szremska et al. 2003, Janz et al. 2006a, Drakos et al. 2007, Papoudou-Bai et al. 2015). In Thymozyten ist eine starke Ausprägung von JUND zu sehen, dagegen sind JUN und JUNB kaum detektierbar (Meixner et al. 2004, Papoudou-Bai et al. 2016a). BATFs sind in verschiedenen Zellen des Immunsystems unterschiedlich stark ausgeprägt. Während die Expression von BATF und BATF3 auf das hämatopoetische System beschränkt ist, ist BATF2 auch in nicht-hämatopoetischen Geweben exprimiert (Hildner et al. 2008, Su et al. 2008). BATF und BATF3 zeigen eine sich teilweise überlappende Ausprägung in verschiedenen Immunzellen. BATF ist in follikulären TH-Zellen und in TH1-, TH2- und TH17-Zellen exprimiert (Schraml et al. 2009, Ise et al. 2011, Murphy et al. 2013). Darüber hinaus ist BATF in einer Population von GC-B-Zellen zu finden und für die Induktion von AID und die CSR verantwortlich (Betz et al. 2010, Ise et al. 2011). In TH1-Zellen ist ebenfalls BATF3 detektierbar und in geringen Mengen in TH17- und TH2-Zellen. In dendritischen Zellen ist BATF3 der dominierende Faktor in der Gruppe der CD11c⁺ klassischen

dendritischen Zellen, in der es essentielle Funktionen übernimmt (Hildner et al. 2008).

1.6.2 Interaktion von AP-1 mit IRFs

Während JUN- und FOS-Transkriptionsfaktoren eine Transaktivierungsdomäne besitzen, fehlt den BATFs diese Domäne, weshalb für lange Zeit angenommen wurde, dass BATFs nur als transkriptionelle Repressoren fungieren (Aronheim et al. 1997, Echlin et al. 2000, Iacobelli et al. 2000). Aktuellere Studien zeigten, dass BATFs in Kooperation mit IRFs als positive Regulatoren funktionieren und einzigartige, nicht-redundante Funktionen in Immunzellen übernehmen (Ise et al. 2011, Glasmacher et al. 2012, Li et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). Im Gegensatz zum AP-1-Faktor FOS, der ebenfalls Dimere mit JUN bildet, können BATF-JUN Heterodimere mit IRF4 und IRF8 an sogenannten AICE (engl. *AP-1-IRF composite elements*)-Motiven in der DNA binden (Glasmacher et al. 2012, Li et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). Funktionelle Analysen von BATF-Mutanten haben veranschaulicht, dass die spezifische transkriptionelle Aktivität nicht von der DNA-Bindedomäne, sondern dem Leucin-Zipper-Motiv ausgeht. Die Interaktion zwischen BATFs und IRFs wird dabei über drei Aminosäuren vermittelt, die sich im Bereich der bZIP-Domäne von BATF und BATF3 befinden (Tussiwand et al. 2012). Es wird angenommen, dass die drei Aminosäuren in der bZIP-Domäne von BATF und BATF3 mit der sogenannten IRF-assoziierten Domäne von IRF4 und IRF8 interagieren (Glasmacher et al. 2012). IRF4- und BATF-defiziente B- und T-Lymphozyten zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp, was darauf hinweist, dass diese beiden Faktoren gemeinsame Zielgene besitzen. IRF4-defiziente Mäuse weisen ebenso wie BATF-defiziente Mäuse keine follikulären TH-Zellen auf und können aufgrund fehlender AID-Ausprägung keine CSR vollziehen (Klein et al. 2006, Ise et al. 2011). Dass IRF4 und BATF überlappende AICE-Motive im Genom von TH17-Zellen erkennen und binden, wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitationen mit anschließender Sequenzierung (ChIP-Seq) identifiziert (Ise et al. 2011, Ciofani et al. 2012, Glasmacher et al. 2012). IRF4 oder IRF8 binden zusammen mit BATF-JUN-Heterodimeren das AICE-Motiv, welches ebenfalls in TH2-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen benutzt wird.

1.6.3 Die Funktion von BATFs in den Zellen des Immunsystems

BATFs sind wichtige Transkriptionsregulatoren des Immunsystems und übernehmen entscheidende Funktionen bei der Produktion von Antikörpern, in der Entwicklung von klassischen dendritischen Zellen und verschiedenen T-Zell-Populationen. Obwohl BATF und BATF3 zell-spezifische Funktionen in verschiedenen Immunzellen aufweisen, haben mehrere Studien die Möglichkeit der funktionellen Kompensation von BATFs gezeigt. So können sowohl BATF als auch BATF2 während einer Infektion die Entwicklung von CD8 α^+ klassischen dendritischen Zellen (engl. *classical dendritic cell*, cDC) in einer BATF3-defizienten Maus wiederherstellen (Tussiwand et al. 2012). Wiederum kann die retrovirale Expression von BATF3 in BATF-defizienten Zellen die Funktionen von BATF, die CSR in B-Zellen und die Differenzierung zu TH17-Zellen, übernehmen. Hildner et al. beschrieben als Erste das Fehlen von CD8 α^+ -cDCs in einer BATF3-defizienten Maus, obwohl BATF3 in CD8 α^+ und auch CD8 α^- -DCs zu detektieren ist. Dies indiziert, dass BATF3 mit einem weiteren CD8 α^+ -cDC-spezifischen Faktor, vermutlich IRF8, interagiert, um die Aktivierung dieses transkriptionellen Programmes, die Differenzierung zu CD8 α^+ -cDC, festzulegen (Murphy et al. 2013). Des Weiteren übernehmen BATF3-abhängige CD8 α^+ -cDCs eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Selbsttoleranz im Thymus. Während der Entwicklung von Thymozyten werden Selbst-Antigene den Thymozyten nicht nur von medullären thymischen Epithelzellen präsentiert, sondern auch von BATF3-abhängigen CD8 α^+ -cDCs (Perry et al. 2014). Für BATF wurde postuliert, dass dieser Faktor mit IRF4 als „Pionierfaktor“ in T-Zellen funktioniert (Ciofani et al. 2012). Pionierfaktoren sind die ersten Transkriptionsfaktoren, die eine Zielsequenz in kondensiertem Chromatin binden und für die Dekondensation des Chromatins an entsprechender Stelle sorgen. BATF spielt bei der Differenzierung von Effektor-T-Zellen eine wichtige Rolle (Schraml et al. 2009, Betz et al. 2010, Ise et al. 2011, Glasmacher et al. 2012, Kurachi et al. 2014). BATF und BATF3 sind beide in der Regulation von TH2-Zellen involviert, da ausschließlich BATF^{-/-} BATF3^{-/-}-TH2-Zellen Defekte in ihrer IL-4- und IL-10-Produktion zeigen. In TH2-Zellen, die eine Defizienz von nur einen der beiden BATFs aufweisen, lassen sich keine Defekte der Zytokinproduktion beobachten (Hildner et al. 2008, Tussiwand et al. 2012). Während BATF-Proteine also teilweise funktionelle Kompensation aufweisen, bestimmt ihre Interaktion mit den jeweiligen IRF das transkriptionelle (Differenzierungs-)Programm.

In Zentrozyten wird die Ausprägung von BATF durch den Transkriptionsfaktor FOXO1 gesteuert und die Deletion von BATF führt zu einer verminderten Proliferation der GC-B-Zellen (Inoue et al. 2017). Ein Teil der Zentrozyten, die sich auf den Wiedereintritt in die dunkle Zone vorbereiten, ist durch Expression von MYC gekennzeichnet und prägt ebenfalls hohe Level von BATF aus (Dominguez-Sola et al. 2012, Inoue et al. 2017).

1.6.4 AP-1-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese von Lymphomen

Die deregulierte Aktivität von Signalwegen spielt in der Pathogenese von Lymphomen eine entscheidende Rolle. Für verschiedene AP-1-Faktoren wurde eine aberrante Ausprägung in Lymphomen gezeigt, allerdings sind die molekularen Mechanismen von AP-1 in der Lymphompathogenese weitgehend ungeklärt (Papoudou-Bai et al. 2016b).

Mathas et al. konnten eine starke Aktivität von JUN und JUNB in HRS-Zellen nachweisen (Mathas et al. 2002). Weitere immunhistochemische Analysen konnten ebenfalls eine starke Ausprägung von JUN, phosphoryliertem JUN und JUNB in ALCL- und cHL-Zellen beobachten (Drakos et al. 2007, Eckerle et al. 2009). AP-1-Aktivität wird für die Proliferation von HRS-Zellen benötigt und reguliert die Expression von CCND1, CCR7 und MET (Mathas et al. 2002). Ein weiterer AP-1-Transkriptionsfaktor, der für das Überleben von HRS-Zellen wichtig ist, ist ATF3, der ebenfalls in den Tumorzellen des cHLs und des ALCLs stark ausgeprägt wird (Janz et al. 2006a). Weitere Zielgene von AP-1 im cHL sind Galectin-1 und PDL1, die zur Immunevasion der HRS-Zellen beitragen (Juszczynski et al. 2007, Rodig et al. 2008, Green et al. 2012). Die Inhibition von Galectin-1 in Ko-Kulturen von cHL-Zelllinien und aktivierten T-Zellen führt zu einer erhöhten T-Zell-Viabilität und einer Wiederherstellung des TH1- und TH2-Zell-Verhältnisses. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Galectin-1 zu einer Expansion von CD4⁺CD25⁺⁺FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Juszczynski et al. 2007). Verschiedene Studien haben die funktionelle Relevanz von CD30- und JUNB-Expression in ALCL- und cHL-Zellen näher untersucht und veranschaulichen, dass CD30 ERK1/2 aktiviert, was wiederum die Ausprägung von JUNB verstärkt (Watanabe et al. 2005). Die Herunterregulation von JUNB in NPM-ALK-exprimierenden Zellen führt zu einer Reduktion des sich in

der G2/M-Phase befindlichen Zellanteils (Staber et al. 2007). Dies impliziert, dass JUNB im ALK⁺-ALCL die Proliferation der Tumorzellen positiv beeinflusst. Studien von Atsaves et al. zeigten eine Regulation von AKT1 durch JUN und JUNB im ALK⁺-ALCL und eine Reduktion der AKT1-Level durch Herunterregulation von JUN und JUNB (Atsaves et al. 2015). Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Inhibition von STAT3 und AP-1 synergistische Effekte auf die Proliferation der ALCL-Zellen ausübt. In einem NPM-ALK-Lymphom-Mausmodell konnte die essentielle Funktion von JUN und JUNB in Tumorausbildung und -wachstum identifiziert werden (Laimer et al. 2012). In ABC-DLBCL (engl. *activated B-cell* DLBCL)-Zelllinien sind CARMA1 und MYD88 für die Aktivierung von JUN, JUNB und ATF3 verantwortlich und JUN/ATF-Komplexe tragen zum Tumorwachstum im ABC-DLBCL bei (Juilland et al. 2016). Blonska et al. identifizierten aktives JUN in einer Gruppe von DLBCL und charakterisierten verschiedene Zielgene von JUN wie Oberflächenrezeptoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle. So führt die Herunterregulation von JUN zu einer reduzierten Zelladhäsion von Lymphomzellen an extrazelluläre Matrixproteine und verlangsamt das Wachstum von subkutanen Tumoren in Xenograft-Mausmodellen (Blonska et al. 2015).

Die genaue Funktion der BATFs in Lymphomen ist bisher kaum charakterisiert. So führt die Überexpression von BATF in T-Zellen zu einem lymphoproliferativen Defekt in der Maus, welcher durch eine polyklonale T-Zell-Expansion charakterisiert ist (Logan et al. 2012). Im PMBL und cHL konnte eine starke BATF3-mRNA-Expression gezeigt werden (Rosenwald et al. 2003, Schwering et al. 2003a, Tiacci et al. 2012). Immunhistochemische Färbungen von ALCL-Fällen identifizierten BATF3 als eines der am stärksten ausgeprägten Proteine im ALCL (Eckerle et al. 2009). Eine funktionelle Charakterisierung von BATF3 in Lymphomen fehlt allerdings bisher.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularen Mechanismen in der Pathogenese von CD30⁺-Lymphomen sind unzureichend verstanden. Verschiedene Studien haben gemeinsame genetische Läsionen in den konstitutiv aktiven Signalwegen dieser Lymphome identifiziert. Ein Merkmal dieser Lymphome ist die deregulierte AP-1-Aktivität und die starke Ausprägung von BATF3. Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Relevanz des AP-1-Faktors BATF3 näher untersucht werden. Dazu soll

zunächst die Ausprägung von BATF3 auf Proteinebene in primären CD30⁺-Lymphomen und in Lymphom-Zelllinien analysiert werden. Anschließend soll BATF3 mittels lentiviraler Transduktion von spezifischen shRNAs (engl. *small hairpin* RNAs) in Lymphom-Zelllinien herunterreguliert werden und die Konsequenz auf das Überleben und die Proliferation der Zellen nach BATF3-Herunterregulation aufgeklärt werden. GEP von transduzierten Lymphomzellen sollen Zielgene, Gensignaturen und Signalwege identifizieren, die durch Herunterregulation von BATF3 verändert sind und physiologische Effekte von HRS-Zellen bedingen. Schließlich sollen die Mechanismen untersucht werden, die zu der starken, konstitutiven Ausprägung von BATF3 in Lymphomzellen beitragen.

In einem zweiten Projekt soll die genetische Analyse von Kombinationslymphomen erfolgen, um einen besseren Einblick in die Mehrschritt-Pathogenese von Lymphomen zu erhalten. Dazu sollen genetische Läsionen in Kombinationslymphomen durch Tiefensequenzierungen identifiziert und gemeinsame sowie separate Mutationen charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Liste aller Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Geräte	Hersteller (Name, Sitz)
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA Analysegerät Synergy HT	BIO-TEK Instruments Inc., Winooski
Gefrierschrank	Bosch GmbH, Gerlingen Liebherr AG, Bulle
Gel Dokumentation UVP GelDoc It Imaging System	Analytik Jena AG, Jena
Inkubator C200	Labotect, Rosdorf Mettler GmbH, Schwabach
Kühlschrank	Liebherr AG, Bulle
Laminar Flow Werkbank UVF 6.12	BDK Luft- und Raumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Mikroskop Zeiss IM35	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowelle GT 8804	General Technic, Howald
Nanodrop ND-1000	Peqlab GmbH, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Polymerase-Kettenreaktions-(PCR) Maschinen (Eppendorf Mastercycler gradient; Biometra UNO-II and Professional Thermocycler)	Eppendorf AG, Hamburg Biometra GmbH, Göttingen
Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) Maschine ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems, Waltham
Schüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison
Sequenzierer 3130 Genetic Analyzer Illumina HiSeq2500	Applied Biosystems, Waltham Illumina Inc., San Diego
Vortexmischer	Scientific Industries Inc., Bohemia
Waage AE240 DR	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Western-Blot Detektionssystem Fusion FX7	Peqlab, Deutschland
Zellsortierer BD FACS Aria III, BD FACS DIVA	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifuge Hettich EBA 12; Himac CT 15E; Thermo Fisher Scientific Megafuge 1.0R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen Hitachi Koki Co., Japan Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Nährmedien, Puffer und Lösungen. Die einzelnen Komponenten von Puffer oder Medien, die selber angesetzt wurden, wurden von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Bezeichnung	Hersteller/ Zusammensetzung
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Betain	Thermo Fisher Scientific
Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequenzierungskit	Thermo Fisher Scientific
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Thermo Fischer Scientific
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Expand High Fidelity-Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Basel
Gel red	Biotium Inc., Fremont
Green-Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 100 bp ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 1 kb ladder	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	Carl Roth GmbH
LB-Medium	1% Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1% Kochsalz (NaCl), pH 7,0
Laemmli-Ladepuffer (4x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific
Orange-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific
PBS	PAN Biotech GmbH GmbH, Aidenbach
Reverse Transkriptase-Puffer (10x)	Qiagen, Hilden
RIPA Lyse-Puffer	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Tris/Glycine/SDS-Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Sequenzierungspuffer (5x)	Applied Biosystems
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml Eisessig, H ₂ O, pH 8,0
Tango-Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
TBS (10x)	24 g Tris Base, 88 g NaCl, pH 7,6
TBST (1x)	100 ml TBS (10x), 900 ml H ₂ O, 2.5 ml 20% Tween-20
Trypanblau	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	PAN Biotech GmbH GmbH
Tween-20	Carl Roth GmbH

2.1.3 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung
BL-2	BL
DAUDI	BL
DEV	NLPHL
HDLM-2	cHL (T-Zell-Ursprung)
HEK 293 T	embryonale Nierenzellen
Karpas 299	ALK ⁺ -ALCL
Karpas 1106P	PMBL
KM-H2	cHL
L-1236	cHL
L-428	cHL
MedB-1	PMBL
NAMALWA	BL
Oci-Ly3	ABC-DLBCL
RAJI	BL
SR-786	ALK ⁺ -ALCL
SU-DHL-1	ALK ⁺ -ALCL
SU-DHL-4	GCB-DLBCL
SU-DHL-6	GCB-DLBCL
SUP-HD1	cHL
U-HO1	cHL
U266	Multiples Myelom (MM)

2.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
BATF3_seqEx2_fw	GACAGGGCAGAAAAGGGTAAG	Sanger-Sequenzierung
BATF3_seqEx2_rv	AACAGTCATCACCCCCACTC	
BATF3_seqEx3_fw	GGACATGCGTAATGAGACAGC	
BATF3_seqEx3_rv	CAAGACCCATGAGCCACAG	
MYC AP-1 site_fw	GCGGGTTACATACAGTGCAC	SYBR Green qRT-PCR
MYC AP-site_rv	TTTCCAGGTCCTCTTTCCCC	
STAT site A_fw	TCCAGATCCCCAAACCTGTC	
STAT site A_rv	CTGTGGGAGGGAACGAGG	
STAT site B_fw	AAACACCGACCCCAAAACAC	

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
STAT site B_rv	GTCCCAAATCCCACCCCTG	
STAT site C_fw	TCTTTGCCTCTCTAGAAGACTGT	
STAT site C_rv	CCAAGAGGTACAAACAAGGAAAA	
MYC Up_fw	AGCAGAGACAGGCCAGTGAG	
MYC Up_rv	TGCAACCCTGCCTTACTTTG	
MYC Intron_fw	CCAGCAGCGACTCTGGTAAG	
MYC Intron_rv	TGAGCTCCCAAATCTCTCCA	
MYC DN_fw	CAGCACTTTGAGAGGCCAAG	
MYC DN_rv	GCATGCATCACCCAGCTAAT	
sh1BATF3_21BH_fw	GATCGGTGCTCAGAGAAGTCGGAAGAATCAAGA GTTCTTCCGACTTCTCTGAGCATTTTT	RNA-Interferenz
sh1BATF3_21BH_rv	AGCTAAAAATGCTCAGAGAAGTCGGAAGAACTCT TGATTCTTCCGACTTCTCTGAGCACC	
sh2BATF3_21BH_fw	GATCGGGGCACTGAAGGAGCACGAGAATCAAGA GTTCTCGTGCTCCTTCAGTGCCTTTTT	
sh2BATF3_21BH_rv	AGCTAAAAAGGCACTGAAGGAGCACGAGAACTC TTGATTCTCGTGCTCCTTCAGTGCCCC	
sh3BATF3_21BH_fw	GATCGGGGCTGCTCTGCCCTATGAACTTTCAAGAG AAGTTCATAGGGCAGAGCAGCTTTTT	
sh3BATF3_21BH_rv	AGCTAAAAAGCTGCTCTGCCCTATGAACTTCTCT TGAAAGTTCATAGGGCAGAGCAGCCC	
sh4BATF3_21BH_fw	GATCGGGGCCACCCTCAGGAGTGACTTTCAAGA GAAGTCACTCCTGAGGGTGGCCTTTTT	
sh4BATF3_21BH_rv	AGCTAAAAAGGCCACCCTCAGGAGTGACTTCTCT TGAAAGTCACTCCTGAGGGTGGCCCC	
sh1MYC_fw	GATCCCTATGAACTTGTTTCAAATGTCAAGAGCA TTTCAAAGAACTTCATAGCTTTTT	
sh1MYC_rv	AGCTAAAAACCTATGAACTTGTTTCAAATGCTCTT GACATTTGAAACAAGTTCATAGG	
sh2MYC_fw	GATCCGATTCTTCTAACAGAAATGTCAAGAGCA TTTCTGTTAGAAGGAATCGTTTTT	
sh2MYC_rv	AGCTAAAAACGATTCTTCTAACAGAAATGCTCTT GACATTTCTGTTAGAAGGAATCG	
shNT_fw	GATCGATCTCGATATCTAAGCTATTTCAAGAGAA TAGCTTAGATATCGAGATCTTTTT	
shNT_rv	AGCTAAAAAGATCTCGATATCTAAGCTATTCTCTT GAAATAGCTTAGATATCGAGATC	

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
sh1IRF4_fw	GATCGGCCGCCATTCTCTATTCAAGATCAAGAG TCTTGAATAGAGGAATGGCGGTTTT	
sh1IRF4_rv	AGCTAAAAACCGCCATTCTCTATTCAAGACTCT TGATCTTGAATAGAGGAATGGCGGCC	
sh2IRF4_fw	GATCGGGTGCCATTTCTCAGGGAAGTATCAAGA GTACTTCCCTGAGAAATGGCACTTTTT	
sh2IRF4_rv	AGCTAAAAAGTGCCATTTCTCAGGGAAGTACTCT TGATACTTCCCTGAGAAATGGCACCC	
VH1	CAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA	IgV-Gen-Analyse
VH2	GTCCTRCGCTGGTGAAACCCACAC	
VH3	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG	
VH4	GACCCTGTCCCTCACCTGCRCTGTC	
VH5	AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGARG	
VH6	ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG	
3'JH1,2,4,5	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	
3'JH3	ACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	
3'JH6	ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT	
5'JH1,4,5	GACGGTGACCAGGGTKCCCTGGCC	
5'JH2	GACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC	
5'JH3	GACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC	
5'JH6	GACGGTGACCGTGGTCCCTTKGCC	
Vk1	GACATCCRGWTGACCCAGTCTCCWTC	
Vk2	CAGWCTCCACTCTCCCTGYCCGTCA	
Vk3	TTGTGWTGACRCAGTCTCCAGSCACC	
Vk4	AGACTCCCTGGCTGTTCTCTGGGC	
3'Jk1.2.4	ACTCACGTTTGATYTCCASCTTGGTCC	
3'Jk3	GTACTTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC	
3'Jk5	GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC	
5'Jk1.2	TTGATYTCCASCTTGGTCCCYTGGC	
5'Jk3	TTGATACCACTTTGGTCCCAGGGC	
5'Jk4	TTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGC	
5' Jk5	TTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC	

R = A oder G ; Y = C oder T ; W = A oder T

2.1.5 TaqMan-Sonden

Tabelle 5: Liste aller verwendeten TaqMan-Sonden.

Name	Produktnummer	Hersteller
ACTINB	HS0106060665_g1	Applied Biosystems
BATF3	HS00232744_m1	Applied Biosystems
CREBL2	Hs00230923_m1	Applied Biosystems
FOS	Hs00170630_m1	Applied Biosystems
GAPDH	HS02758991_g1	Applied Biosystems
JUN	Hs01103582_s1	Applied Biosystems
MAP3K8	Hs00178297_m1	Applied Biosystems
SH3RF1	Hs00325806_m1	Applied Biosystems
SMAD4	Hs00929647_m1	Applied Biosystems

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper. Alle Antikörper erkennen humane Proteine.

Name	Herkunft	Klon	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-ACTIN-HRP	Maus	AC-74	A3854-200U2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	1:100000
Anti-BATF	Kaninchen	D7C5	8638	Cell Signaling Technology Inc., Cambridge	1:1000
Anti-BATF3	Maus	3H1	H00055509-M04	Abnova GmbH, Heidelberg	1:1000
Anti-CD27-FITC	Maus	M-T271	557329	BD Biosciences	1:30
Anti-CD20-PerCPCy5.5	Maus	2H7	560736	BD Biosciences	1:30
Anti-CD20cy	Maus	L26	M075	Dako GmbH, Hamburg	1:100
Anti-CD3	Kaninchen	polyklonal	A0452	Dako GmbH	1:100
Anti-CD30-PE	Maus	BerH2	550041	BD Biosciences	1:20
Anti-CD30	Maus	BerH2	M075129-2	Dako GmbH	1:100
Anti-CD38-APC	Maus	HIT2	555462	BD Biosciences	1:30
Anti-CD5	Maus	4C7	M3641	Dako GmbH	1:200
Anti-IRF4	Ziege	polyklonal	sc-6059	Santa Cruz	1:3000

Name	Herkunft	Klon	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-IRF4	Maus	E-7	sc-377383	Biotechnology Inc.	1:3000
Anti-IRF5	Maus	10T1	Sc-56714		1:1000
Anti-JUN	Maus	G-4	sc-74543		1:3000
Anti-JUN	Kaninchen	polyklonal	sc-1694		1:3000
Anti-JUNB	Maus	C-11	sc-8051		1:3000
Anti-JUNB	Kaninchen	polyklonal	sc-73		1:3000
Anti-LMP1	Maus	CS.1-4	M0897	Dako GmbH	1:100
Anti-MYC	Kaninchen	Y69	31072	Abcam, Cambrigde	1:3000
Anti-pSTAT3	Kaninchen	polyklonal	9131	Cell Signaling Technology Inc.	1:1000
Anti-pSTAT5	Kaninchen	polyklonal	9351		1:1000
Anti-pSTAT6	Kaninchen	polyklonal	9361		1:1000
Anti-STAT3	Kaninchen	polyklonal	sc-7179	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:2000
Anti-STAT5	Kaninchen	polyklonal	Ab7969	Abcam	1:2000
Anti-STAT6	Kaninchen	polyklonal	9362	Cell Signaling Technology Inc.	1:1000
Anti-TBP	Maus	1TBP18	Ab818	Abcam	1:1000
Anti-Tubulin	Kaninchen	TU-20	T-1315	MP Biomedicals GmbH, Eschwede	1:2000

Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper.

Name	Herkunft	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG HRP	Ziege	115-036-062	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:4000
Anti-Rabbit IgG HRP	Affe	711-036-152	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:5000
Anti-Ziege IgG HRP	Affe	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:4000

2.1.7 Restriktionsenzyme

Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme. Alle Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher Scientific bestellt.

Restriktionsenzym	Erkennungs-/Schnittstelle (5´-3´ Richtung)
<i>BamHI</i>	G↓GATCC
<i>BglII</i>	A↓GATCT
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC
<i>SpeI</i>	A↓CTAGT
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG

2.1.8 Kits

In dieser Arbeit verwendete Kits sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
<i>Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I</i>	BD Becton Dickinson
<i>CaspGLOW™ Red Active Caspase-3 Staining Kit</i>	BioVision Inc.
<i>CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>BCA protein assay Kit</i>	Thermo Fischer Scientific
<i>Gene Print 10 System</i>	Promega GmbH
<i>Gentra Puregene Cell Kit</i>	Qiagen
<i>innuPREP DOUBLEpure Kit</i>	Analytik Jena
<i>mi-Plasmid Miniprep Kit</i>	Metabion GmbH, Planegg
<i>NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 Kit</i>	Roche Diagnostics
<i>Nuclear/Cytosol Fractionation Kit</i>	BioVision Inc.
<i>Nucleo Bond Xtra Maxi</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>Omniscript RT Kit</i>	Qiagen
<i>PeqGold Micro Spin Total RNA Kit</i>	PeqLab
<i>QIAshredder</i>	Qiagen
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>RNeasy Micro Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
<i>TruSeq DNA Sample Prep Kit v1</i>	Illumina Inc.

2.1.9 Computersoftware und Statistik

Zur Erstellung der Grafiken und Statistiken wurde GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego) verwendet. Für die Darstellung von Sequenzen und Chromatogrammen wurde das Programm DNASTAR SeqMan Pro v9.0.4 (DNASTAR Inc., Madison) verwendet. Zur Quantifizierung von Proteinen wurde die *Phoretix 1D*-Software (TotalLab, Newcastle) benutzt. Humane IgV-Gene wurden mit der IMGT/V-Quest-Datenbank untersucht und ausgewertet. Für die statistische Analyse der Daten wurde ein gepaarter zweiseitiger t-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Proben sind dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die verwendeten Suspensionszellen wurden in RPMI1640 mit 10% Kälberserum (FCS; PAN Biotech GmbH GmbH) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech GmbH) kultiviert. MedB-1, Karpas 1106P und SU-DHL-1 wurden in RPMI1640 mit 20% FCS kultiviert. Die U-HO1-Zelllinie wurde in IMDM (PAN Biotech GmbH) mit 10% FCS, die HEK 293T-Zelllinie in DMEM (PAN Biotech GmbH) mit 10% FCS und die ABC-DLBCL-Zelllinie Oci-Ly3 in RPMI1640 mit 20% humanen Serum (PAN Biotech GmbH) kultiviert. Für lentivirale Arbeiten wurden adhärente HEK 293T-Zellen nach Entfernung des Mediums mit 10 ml Trypsin (PAN Biotech GmbH) inkubiert. Nach Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurden die Zellen für 5 Minuten bei 400x g zentrifugiert und in frischem Medium in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Die Identität der Zelllinien wurde etwa alle drei Monate mittels Mikrosatelliten-PCR (auch STR-Analyse genannt, engl. *short tandem repeat profiling*; Gene Print 10 System, Promega GmbH) analysiert. Ebenfalls wurden die Zelllinien etwa alle 3 Monate auf Mykoplasmen-Kontaminationen getestet. Zweimal wöchentlich wurden die Zelllinien mit frischem Medium versorgt und auf die optimale Zellkonzentration eingestellt. Bei der Einstellung der optimalen Zellkonzentration für die jeweilige Zelllinie wurde sich an die Empfehlung auf der Homepage des DSMZ (deutsche

Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) gehalten (Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 2017).

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen entweder 1:10 mit PBS oder 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Die Unterscheidung von vitalen und abgestorbenen Zellen erfolgte durch Versetzen der Zellsuspension mit einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung. Die Trypanblau-Lösung kann nur die Zellmembran von abgestorbenen Zellen passieren, jedoch nicht in vitale Zellen eindringen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Sortierung von cHL- und ALCL-Zelllinien wurden an einem *FACS DIVA*-Durchflusszytometer durchgeführt. Die Analyse von Zelllinien erfolgte an einem *FACS Canto*-Durchflusszytometer. Vor der Sortierung wurden die Zellen zweimal mit PBS mit 0,5% Rinderserum-Albumin (BSA) gewaschen. Zur Unterscheidung von lebenden und abgestorbenen Zellen wurde die Zellsuspension mit 1 µg/ml DAPI versetzt und die DAPI-negative Zellfraktion wurde sortiert. DAPI interkaliert mit der DNA von Zellen und kann sehr schnell die Zellmembran von toten Zellen passieren, jedoch nur sehr langsam durch die Zellmembran lebender Zellen dringen. Die durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von primärem, humanem Material erfolgte an einem *FACS Aria III*-Durchflusszytometer.

2.2.4 Interleukin (IL)-Stimulation

2×10^5 Zellen wurden vor der Stimulation ausgezählt und zweimal mit PBS durch 5-minütiges Zentrifugieren (300x g) gewaschen. Mit Waschen ist das Zentrifugieren der Zellen, das Abnehmen des Überstandes, das Resuspendieren des Zellpellets in PBS und das erneute Zentrifugieren der Zellen gemeint. Die Zellen wurden nun 6 Stunden in serum-freiem Medium gehalten und anschließend für 30 Minuten mit rekombinantem IL-13 (5 ng/µl) oder rekombinantem IL-21 (10 ng/µl; PeproTech GmbH) stimuliert.

2.2.5 Inhibitor-Versuche

2×10^6 Zellen wurden in 6-well-Kultivierungsplatten ausgesät und für 24 Stunden mit den JAK2-Inhibitoren TG101348 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) oder AZD1480 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) in verschiedenen Konzentrationen behandelt (TG101348; 5, 10 und 20 μM ; AZD1480; 0,25, 0,5, 1 und 5 μM). Da die Inhibitoren beide in DMSO gelöst wurden, wurden als unbehandelte Kontrollen Zellen nur mit DMSO behandelt. Hier wurde das äquivalente Volumen DMSO, welches für die höchste Inhibitorkonzentration verwendet wurde, zu den Zellen hinzugegeben.

2.2.6 Annexin V- und PI-Färbung

Zur Analyse des frühen Zelltods wurde das *Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I* (BD Becton Dickinson) nach Herstellerangaben verwendet. Da die transduzierten Zellen GFP exprimieren, wurde das Kit in Kombination mit APC-konjugiertem Annexin V verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches sich in einer intakten Zelle an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befindet, jedoch am Anfang der Apoptose externalisiert wird. Zellen mit intakter Zellmembran sind für Propidiumiodid (PI) undurchlässig, sodass PI zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen verwendet werden kann. Es interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuren und färbt die DNA im Zellinneren an (Vermes et al. 1995). Für die Färbung wurden 3×10^5 GFP⁺-sortierte Zellen in 100 μl 1x Annexin V-Bindepuffer aufgenommen und mit 1,5 μl Annexin V-APC für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 200 μl 1x Annexin V-Bindepuffer zugegeben und mit 1 μl PI-Lösung (finale Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am *FACS Canto*.

2.2.7 Caspase 3-Färbung

Zur Detektion von aktiver Caspase 3 in lebenden Zellen wurde das *CaspGLOW™ Red Active Caspase 3 Staining Kit* verwendet. Aktive Caspasen spalten während des programmierten Zelltods an der DEVD-Aminosäuresequenz eines Proteins. Bei der Caspase 3-Färbung wird ein Fluoreszenz-markiertes DEVD-Derivat (DEVD-FMK) verwendet, das in lebenden Zellen von Caspase 3 erkannt und gebunden wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Aktivität der Caspase. Für die Messung

von aktiver Caspase wurden 3×10^5 Zellen in 300 μ l Medium mit 1 μ l Red-DEVD-FMK versetzt und für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in Waschpuffer resuspendiert und bei 400x g für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen für die Analyse am *FACS Canto* in 300 μ l Waschpuffer aufgenommen.

2.2.8 Proliferationsassay

Der Zellmembranfarbstoff *Vybrant DiD* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) wurde zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit von transfizierten Zellen verwendet. Der fluoreszierende Farbstoff färbt die Zellmembran an und verteilt sich gleichmäßig bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen, dadurch wird das Fluoreszenzsignal entsprechend der Proliferationsgeschwindigkeit messbar gemacht. 5×10^5 Zellen wurden bei 400x g für 5 Minuten zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml serum-freiem Medium aufgenommen. 3 μ l *Vybrant DiD Cell Labeling Solution* (Thermo Fisher Scientific) wurde pro Ansatz zu den Zellen hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (400x g, 5 Minuten), der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden dreimal in 37°C warmem RPMI1640-Medium mit 10% FCS gewaschen. Die Zellen wurden in der optimalen Zellkonzentration ausgesät und ein Aliquot mit 1×10^5 Zellen wurde abgenommen, um die Färbeintensität zum Messzeitpunkt Tag 0 zu ermitteln. Die Fluoreszenzintensität von Vybrant DiD wurde für die cHL-Zelllinien an Tag 5 und 10 gemessen und ALCL-Zelllinien an Tag 3 und 6 nach Beginn des Experiments, da cHL- und ALCL-Linien unterschiedlich schnell proliferieren.

2.2.9 MTS-Assay

Ein MTS-Assay wurde zur Bestimmung der metabolischen Zell-Aktivität nach JAK2-Inhibition durchgeführt. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) wird von metabolisch aktiven Zellen zu Formazan reduziert, was durch einen Farbumschlag von gelb zu violett sichtbar wird (Berridge et al. 1993). Dieser Farbumschlag kann bei 490 nm gemessen werden und lässt so Rückschlüsse auf die Anzahl metabolischer aktiver Zellen zu. Die folgenden Schritte wurden mit dem *CellTiter 96 AQUEOUS One Solution Cell Proliferation Assay*

durchgeführt. Dazu wurden 1×10^4 Zellen in 96-well Platten ausgesät und in 100 μ l des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen. Anschließend wurden 20 μ l der MTS-Reaktionslösung hinzupipettiert und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm an einem *BioTek Synergy HAT Microplate reader* bestimmt und mit der *KC4 Software* (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) ausgewertet.

2.3 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.3.1 Isolierung und Sortierung von humanen tonsillären B-Zell-Populationen

Die Entnahme und Isolierung von humanen B-Zell-Populationen wurde aus Routine-Tonsillektomien unter Einwilligung der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die Patienten wurden aufgeklärt und erklärten ihr schriftliches Einverständnis vor Probenentnahme und Weitergabe. Tonsillengewebe wurde in PBS mit 0,5% BSA bei 4°C gesammelt und mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestückchen durch ein engmaschiges Sieb gepresst und es wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde die tonsilläre Zellsuspension vorsichtig auf 15 ml einer Ficoll Lösung (PAN Biotech GmbH) gegeben und für 35 Minuten bei 400x g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ficoll ist ein Sucrose-Polymer mit einer Dichte von 1,07 g/l, welches durch Zentrifugation die Auftrennung von mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen) ermöglicht. Die mononukleären Zellen haben eine geringere Dichte als das Ficoll und lagern sich in der Interphase-Schicht zwischen PBS und Ficoll ab, während Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer sich in der untersten Schicht unter dem Ficoll sammeln. Die Interphase, welches die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, *PMBC*) enthält, wurde abgenommen, es wurden 5 ml PBS hinzugefügt und die Zellen wurden für 5 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in PBS aufgenommen und erneut für 5 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Anschließend wurde eine magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. *magnetic activated cell sorting*, *MACS*) durchgeführt, um CD30⁺-B-Zellen anzureichern. Das gewaschene Zellpellet

wurde zunächst mit 200-300 µl anti-CD3-MicroBeads (Miltenyi Biotech) für 20 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend CD3-positive T-Zellen zu depletieren und B-Zellen anzureichern. Anschließend wurden 10 ml PBS mit 0,5% BSA hinzugefügt und bei 400x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml PBS mit 0,5% BSA aufgenommen und auf eine MACS-LD Säule (Miltenyi Biotech) gegeben. Die MACS Säule wurde vorher mit 5 ml PBS mit 0,5% BSA äquilibriert. Nach Zugabe der Zellsuspension wurde die Säule dreimal mit 3 ml PBS mit 0,5% BSA gewaschen. Der CD3-negative Durchfluss, der B-Zellen enthält, wurde nun bei 400x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml PBS mit 0,5% BSA aufgenommen und mit 100 µl anti-CD30-Microbeads für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden 10 ml PBS hinzugegeben und die Zellsuspension wurde bei 400x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet erneut in 2 ml PBS mit 0,5% BSA aufgenommen und auf eine zuvor äquilibrierte MACS-Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml PBS mit 0,5% BSA gewaschen und für die Elution wurden 5 ml PBS mit 0,5% BSA auf die Säule gegeben. Das CD30-positive Eluat sowie der CD30-negative Durchfluss wurden zentrifugiert (5 Minuten, 400x g) und jeweils in 100 µl PBS mit 0,5% BSA aufgenommen. Die anschließende Färbung der beiden Fraktionen erfolgte mit anti-CD20-PerCPCy5.5, anti-CD38-APC, anti-CD27-FITC und anti-CD30-PE Antikörpern (BD Becton Dickinson). Die Mengenangaben der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet. Von der CD30⁺-Fraktion wurden GC-B-Zellen (CD20^{hi}, CD38⁺, CD30⁺) und Nicht-GC-B-Zellen (CD20⁺, CD38⁻, CD30⁺) und von der CD30⁻ Zellfraktion wurden Gedächtnis-B-Zellen (CD20⁺, CD38⁻, CD27⁺), GC-B-Zellen (CD20^{hi}, CD38⁺) und Plasmazellen (CD20⁺, CD38^{hi}) sortiert. Die Sortierung wurde von Dr. Marc Weniger durchgeführt.

2.3.2 Färbung von Kombinationslymphomen

Die verwendeten Lymphknotenbiopsate wurden von Prof. Dr. Hansmann vom Universitätsklinikum Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Die Entnahme ist unter Einwilligung der lokalen Ethikkommission erfolgt. Die Patienten wurden aufgeklärt und erklärten ihr schriftliches Einverständnis vor Probenentnahme.

Die Proben von Patienten mit Kombinationslymphom wurden für die anschließende IgV-Gen-Analyse und Exom-Sequenzierung gefärbt und mikrodisektiert. Es wurden 5 bis 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Ein

Großteil der Fälle wurde mit Eosin und Hämalaun gefärbt. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in 100% EtOH fixiert und anschließend getrocknet. Es folgte die 5-minütige Färbung der Schnitte mit einer Hämalaun-Lösung nach Mayer, die zuvor mit 40 Einheiten/ml eines RNase Inhibitors (*Protector RNase Inhibitor*, Roche Diagnostics, Basel) versetzt wurden und dann dreimal mit Wasser gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Schnitte mit einer 2%igen Eosin-Lösung für 45 Sekunden gefärbt und dann dreimal in H₂O gewaschen. Es erfolgte eine kurze Behandlung (etwa 10 Sekunden) der Schnitte mit 100% EtOH. Für die anschließende Mikrodisektion wurden die Schnitte etwa 10 Minuten getrocknet. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend getrocknet. Die weiteren Färbeschritte wurden mit dem *Super Sensitive Link-Label IHC Detection System* (BioGenex, Fremont) durchgeführt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Probe gegeben. Für die Detektion von HRS-Zellen wurde ein anti-CD30-Antikörper (BerH2, Dako, Hamburg) verwendet. CD5⁺-Lymphomzellen wurden mit einem anti-CD5-Antikörper (4C7, Dako) gefärbt. Anschließend wurde die Probe mit 1x TBS gewaschen und mit einer sogenannten *Link-Lösung* inkubiert, welche Bestandteil des *Super Sensitive Link-Label IHC Detection System* ist und den biotinylierten Sekundärantikörper enthält. Nach erneutem Waschen wurde für 30 Minuten eine *Label-Lösung* auf die Schnitte gegeben, welche die Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase enthält. Es wurde anschließend mit 1x TBS gewaschen und es erfolgte die Detektion durch Zugabe des *Permanent Red Substrate-Chromogen Liquids* (Dako). Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Waschen der Schnitte mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Zellkerne wurden daraufhin mit einer Hämalaun-Färbung nach Mayer gegengefärbt. Für die immunhistochemische Färbung von cHL, DLBCL, PMBL und reaktiven Lymphknoten im Rahmen des BATF3-Projektes wurden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete (engl. *formalin-fixed and paraffin-embedded*, FFPE) Gewebeschnitte verwendet. Als primäre Antikörper wurden anti-BATF3 (3H1; Abnova GmbH), anti-MYC (ab31072, Abcam) und anti-phosphoryliertes STAT3 (Y705, M9C6; Cell Signaling Technology Inc.) in einer Verdünnung von 1:200 (abweichend bei BATF3 1:100) benutzt. Für die Detektion wurde das *EnVision System-HRP* (Dako) benutzt. Ein Fall wurde als positiv

gewertet, wenn mindestens 50% der Tumorzellen positiv für das jeweilige Protein von Interesse waren.

2.3.3 Mikrodissektion von Zellen mittels *Laser Microbeam Microdissection* (LMM)

Die Isolation von Einzelzellen erfolgte mittels *PALM MicroBeam* (Carl Zeiss GmbH)-Technologie und wurde am Senckenbergischen Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Hierbei ermöglicht ein fokussierter Laserstrahl das gezielte Ausschneiden von Zellen und der Zielbereich wird gegen die Schwerkraft in ein Reaktionsgefäß katapultiert. Die Mikrodissektion wurde mit der Software-Einstellung RoboLPC und unter 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Für die Exom-Sequenzierung wurden je 3000 Tumor- und Nicht-Tumorzellen mikrodisssektiert und es wurden *AdhesiveCap 200 opaque*-PCR-Gefäße (Carl Zeiss GmbH) verwendet, die ein opakes Haftmittel im Deckel besitzen und eine Puffer-freie Mikrodissektion ermöglichen. Für die IgV-Gen-PCR-Analyse wurden 20 µl 1x *Expand High Fidelity*-Puffer verwendet und in die Deckel von 500 µl Reaktionsgefäßen vorgelegt. Der Puffer wurde zusätzlich mit 0,1% Triton-X 100 versetzt, um die Oberflächenspannung des Puffers zu verringern. Die Proben wurden 2 Minuten bei 10000x g zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Darüber hinaus wurden bei jeder Mikrodissektion noch Schnitte der leeren Membran, sogenannte Membrankontrollen, in Reaktionsgefäßen gesammelt, die als Negativkontrollen dienten.

2.3.4 Exom-Sequenzierung von Kombinationslymphomen

Um ausreichende DNA-Mengen für eine Exom-Sequenzierung zu erhalten, wurde vorher mit der DNA der mikrodisssektierten Kombinationslymphome eine Gesamtgenomvervielfältigung (engl. *whole genome amplification*, WGA) durchgeführt. Die WGA-Proben für dieses Projekt wurden von Dr. Markus Schneider generiert. Die Exom-Sequenzierungen wurden im BioChip-Labor von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass und seinen Mitarbeitern am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Zur „Library“-Herstellung und Anreicherung der Exon-Regionen wurde das *TruSeq DNA Sample Prep Kit v1* (Illumina Inc.) und das *NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 Kit* (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben benutzt. Zur

Sequenzierung wurde ein Illumina *HiSeq2500* Sequenzierer (Illumina Inc.) verwendet und es wurde ein „*Paired-End*“-Lauf mit einer Leseweite von 2 x 100 Basenpaaren (bp) durchgeführt.

Die Daten wurden von Claudia Döring aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann vom Universitätsklinikum Frankfurt am Main ausgewertet und wurden mit der *Genomatix*-Software (*Genomatix Mining Station (GMS)*, *Genomatix Genome Analyzer (GGA)* and *Genomatix GeneGrid*) prozessiert. Das sogenannte Adapter „*Trimming*“, d.h. das Herausschneiden von Adapter-Sequenzen wurde mit der *Trimmomatic* Software (Version 0.33) durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzen mit der *GMS*-Software (Version 2.4.1, *Genomatix Mapper* Version 3.7.6.3) gegen das humane Referenzgenom GRCH37 abgeglichen. Zur Detektion von Einzelnukleotid-Varianten (engl. *single nucleotide variants*, SNVs) und kleinen Insertion und Deletionen (Indels) wurde *SAMtools* verwendet (Li et al. 2009). Potentielle SNVs wurden herausgefiltert, wenn (1) die Lokalisation des SNVs 5 bp von einer potentiellen Insertion oder Deletion liegt, (2) drei oder mehr SNVs innerhalb von 10 bp auftauchen und (3) in ≥ 8 „*Reads*“ ein SNV nur in einer Leserichtung detektierbar ist. Zusätzlich wurden alle SNVs im *Genome Browser* begutachtet. Varianten wurden mit der *1000 Genome*-Datenbank (Genomes Project et al. 2015) abgeglichen und nicht-Krankheits-assoziierte Polymorphismen wurden herausgefiltert. Ausschließlich SNVs, welche in exonischen oder kanonischen Spleißstellen liegen, wurden für die weitere Analyse in Betracht gezogen. Keimbahn-Varianten, die in den Kontrollen auftauchen, wurden herausgefiltert. Bei der Untersuchung der Indels wurden nur diejenigen berücksichtigt, die eine Abdeckung (sogenannte „*Coverage*“) von mindestens 20 Sequenzen (Reads) in Tumor- und Kontroll-Probe hatten. Die Allelfrequenz lag bei mindestens 10%, mindestens 5 unabhängige Reads mussten den Indel anzeigen und es durfte kein Indel in der Kontroll-Probe detektierbar sein.

2.3.5 IgV-Gen-PCR-Analysen von Kombinationslymphomen

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, die zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen benutzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels IgV-Gen-PCR die klonale Verwandtschaft von Kombinationslymphomen untersucht. Vor Amplifikation von IgV-Genen von

mikrodissektierten Zellen wurde ein Proteinase K-Verdau für zwei Stunden bei 55°C durchgeführt. Dazu wurde 1 µl Proteinase K (0,25 g/l PCR grade, Roche Diagnostics) zu den Einzelzellaliquots pipettiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt für 10 Minuten bei 95°C. Die DNA von sortierten Zellen wurde mit dem *Gentra Puregene Cell Kit* (Qiagen) isoliert. Nach Vermessung der DNA-Menge wurden für sortierte Zellen etwa 50 pg DNA, was etwa zehn Zellen entspricht, für die anschließende IgV-Gen-Analyse eingesetzt. Die Vervielfältigung der IgV-Gene erfolgt über eine sogenannte *seminested* Zwei-Runden-PCR. So wird in der ersten Runde eine Multiplex-PCR durchgeführt, bei der eine Kombination aus familienspezifischen VH- und Vk-Oligonukleotiden und 3'JH-Oligonukleotiden (bzw. 3'Jk-Oligonukleotiden; für Sequenzen siehe Tabelle 4) verwendet wird. Die VH-Oligonukleotide sind komplementär zur FR-I der IgV-Gene und wurden so konstruiert, dass sie fast alle IgV-Gene einer Familie erkennen. Gleiches gilt für die Vk-Oligonukleotide. Nach der ersten PCR wurde die amplifizierte DNA in einer zweiten PCR mit einem familienspezifischen VH-Oligonukleotid und einer Mischung aus 5'JH-Oligonukleotiden, die weiter stromaufwärts des J-Gensegmentes lokalisiert sind als die 3'JH-Primer, vervielfältigt. Diese *seminested* PCR ermöglicht eine höhere und spezifischere Ausbeute an PCR-Produkt. Als Positivkontrollen wurde DNA monoklonaler Zelllinien mit bekannter V-Genumlagerung benutzt. Für die IgV-Gen-PCR wurden Laser-mikrodissektierte Einzel- und Zehnzellaliquots pro Probe verwendet sowie Puffer- und Membrankontrollen, die als Negativkontrollen dienten. In der zweiten Runde der IgV-Gen-PCR wurde etwa 100 ng genomische DNA aus B-Zelllinien verwendet. Negativkontrollen, die anstatt DNA H₂O enthielten, fungierten als zusätzliche Kontrollen.

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien für die erste Runde der IgV-Gen-PCR. Das PCR-Reaktionsgemisch wurde auf 21 µl Zellen gegeben, sodass das Gesamtvolumen der PCR 50 µl beträgt.

Reagenzien	Volumen (µl)	Konzentration/ Einheiten (U) der Stamm-Lösung
dNTPs	2,5	2mM je dNTP
10 x Expand <i>High Fidelity</i> PCR-Puffer ohne MgCl ₂	3	
MgCl ₂	4	25 mM
Primer-Mix	5	1 µM
Expand <i>High Fidelity</i> Polymerase	0,5	3,5 U/µl
H ₂ O	14	

Tabelle 11: Das PCR-Programm für die erste Runde der IgV-Gen-PCR.

Temperatur (°C)	Zeit (sek)
95	300
68	Pause für Enzymzugabe
72	60
95	50 (35 Zyklen)
61	30 (35 Zyklen)
72	60 (35 Zyklen)
72	300

Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die zweite Runde der IgV-Gen-PCR. Es wurde 1 µl amplifiziertes Produkt aus dem Reaktionsgefäß der ersten Runde eingesetzt. Die VHL1-PCR-Reaktion erfolgt mit 1,5 mM MgCl₂.

Reagenzien	Volumen (µl)	Konzentration/ Einheiten (U) der Stamm-Lösung
dNTPs	5	2 mM je dNTP
10 x <i>Taq</i> PCR-Puffer ohne MgCl ₂	5	
MgCl ₂	3/5	25 mM
Primer-Mix	5	2,5 µM
<i>Taq</i> Polymerase	0,3	1,5 U/µl
H ₂ O	30,7/28,7	

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der zweiten Runden der IgV-Gen-PCR.

Temperatur (°C)	Zeit (sek)
95	60
95	50 (40 Zyklen)
61	30 (40 Zyklen)
72	60 (40 Zyklen)
72	300

2.3.7 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Zur Extraktion von RNA aus größeren Zellmengen ($\geq 5 \times 10^5$ Zellen) wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Die Isolation von Gesamt-RNA aus kleineren Zellmengen ($\leq 5 \times 10^5$ Zellen) erfolgte mit dem *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) oder dem *PeqGold MicroSpin RNA Kit* (PeqLab). Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA wurde mikrovolumenspektrometrisch am *Nanodrop ND-1000* Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung wird beim *Nanodrop* die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Abschätzung der RNA-Qualität wird zusätzlich die OD bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} gilt als Maß für Verunreinigungen mit Proteinen, genomischer DNA oder aromatischen Substanzen. Die Reverse Transkription wurde mit dem *high capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) mit zufälligen Hexamer-Oligonukleotiden durchgeführt.

2.3.8 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Erweiterung der PCR, welche die Quantifizierung von mRNA ermöglicht. Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der das Endprodukt erfasst wird, erfolgt bei der qRT-PCR die Quantifizierung von mRNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit, d.h. nach jedem Zyklus wird die Amplifikation der mRNA gemessen. Der sogenannte TaqMan-PCR-Assay besteht aus einer fluorogenen Sonde, die aus einem Oligonukleotid zusammengesetzt ist, welches am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencherfarbstoff enthält. Bindet nun eine TaqMan-Sonde an eine spezifische DNA-Sequenz wird der Quencher durch die Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase abgespalten, sodass das Reporter-Molekül fluoreszieren kann. Die Fluoreszenz steigt mit der Akkumulation des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Alle Ansätze wurden in 96- oder 384-well-PCR-Platten im *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) inkubiert (2 min 50°C, 10 min 95°C; (15 sek 95°C, 1 min 60°C) x 40 Zyklen). Als Negativkontrolle wurde für jede TaqMan-Probe H_2O verwendet. Außerdem wurde jede Probe in technischen

Triplikaten pipettiert. Die Software *SDS 2.1* (Applied Biosystems) wurde zur Datenanalyse verwendet.

2.3.9 Klonierungen

Die Klonierung wurde in dieser Arbeit genutzt, um lentivirale Vektoren in Bakterienzellen zu vermehren. Zur Herstellung von lentiviralen Vektoren wurde das *Lentiviral Gene Ontology* (LeGO)-System verwendet (Weber et al. 2008). Die Auswahl von Oligonukleotiden zur Herstellung von *short hairpin* RNA (shRNA) gegen BATF3 wurden mit Hilfe der *PrimerQuest program*-Software (IDT, Coralville) durchgeführt. shRNA-Sequenzen, die gegen MYC oder IRF4 gerichtet sind, wurden aus Publikationen übernommen (Rui et al. 2010, Weilemann et al. 2015). Für die Überexpression von BATF3 wurde der LeGO-iG2-Vektor des LeGO-Systems verwendet, welcher BATF3 und GFP unter Kontrolle des SFFV-Promotors exprimiert. BATF3 und GFP sind durch eine IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. *internal ribosomal entry site*) getrennt, was die Expression von BATF3 und GFP-Reporter von einem Transkript ermöglicht (Weber et al. 2008). Ein Transkript, welches die Ko-Expression zweier Proteine ermöglicht wird als sogenannte bicistronische mRNA bezeichnet (Morgan et al. 1992).

2.3.8.1 Oligonukleotid-Hybridisierung

Für die Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden wurden 100 µM *Forward* und *Reverse* Oligonukleotide in 1x PCR-Puffer gelöst und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide für 5 Minuten in ein Wasserbad (80°C) gegeben. Das Wasserbad wurde ausgeschaltet und die Oligonukleotide über Nacht inkubiert, um eine möglichst effiziente Hybridisierung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Die hybridisierten Oligonukleotide enthielten neben den shRNA-Sequenzen Überhänge für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BglII* zur weiteren Klonierung in den pSUPER-Vektor (OligoEngine, Seattle).

2.3.9.2 Verdau und Ligation

Die shRNAs wurden zuerst in den pSUPER-Vektor kloniert und anschließend unter Verwendung von *XbaI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen zusammen mit dem H1-Promotor in den LeGO-Vektor gebracht. Dazu wurde der pSUPER-Vektor mit *BglII* und *HindIII* verdaut, nach Anleitung des *innuPREP DOUBLEpure Kits* (Analytik Jena) aufgereinigt und anschließend wurden die hybridisierten Oligonukleotide in den Vektor ligiert. Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte nach Anleitung des *Rapid DNA Ligation Kits* (Thermo Fisher Scientific). Die Ligation wird von der *T4 DNA Ligase* durchgeführt, einem Enzym, was die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe mit der 5'-Phosphatgruppe der DNA katalysiert. Die shRNA-Sequenzen wurden zusammen mit dem H1-Promotor aus dem pSUPER-Vektor mit *XbaI* und *XhoI* aus dem Vektor herausgeschnitten und aufgereinigt. Es wurde für die Ligation ein molares Verhältnis von 3:1 zwischen shRNA und LeGO-Vektor gewählt. Die Berechnung des einzusetzenden Inserts erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Menge des Inserts in ng} = 3 \times \frac{\text{Länge des Inserts in bp}}{\text{Länge des Plasmids in bp}} \times \text{Menge des Plasmids in ng}$$

2.3.9.3 Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in Bakterien

10-50 ng Plasmid-DNA wurden mit 10 µl chemisch kompetenter *XL1-blue Escherichia coli* Bakterien (Dako) vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien wurde im Wasserbad bei 42°C für 45 Sekunden durchgeführt. Daraufhin wurde die Suspension für 2 Minuten auf Eis gelagert und mit 200 µl SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden nun für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.9.4 Präparation von Plasmiden

Einzelne Kolonien wurden von den LB-Platten gepickt und in 4 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C für 14-16 Stunden geschüttelt. Für die Amplifikation größerer Plasmidmengen wurden einzelne Kolonien in 250 ml LB-Medium mit 100

µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Aufbereitung der Plasmide erfolgte für kleinere Plasmidmengen mit dem *mi-Plasmid Miniprep Kit* (Metabion) und für größere Plasmidmengen mit dem *Nucleo Bond Xtra Maxi Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben.

2.3.9.5 Sequenzierung nach Sanger

Um die erfolgreiche Insertion der shRNAs in den LeGO-Vektor zu verifizieren und Mutationen der shRNA-Sequenz ausschließen zu können, wurde der Bereich des LeGO-Vektors, der die shRNA-Sequenz enthalten sollte, sequenziert.

Tabelle 14: Sequenzreaktion zur Sequenzierung der shRNA nach Klonierung in den LeGO-Vektor.

Reagenzien	Volumen (µl)	Konzentration der Stamm-Lösung
DNA	1	500 ng/µl
5x Sequenzierungspuffer	3,5	
<i>BigDye terminator v3.1</i>	2	
Primer (<i>Forward</i> oder <i>Reverse</i>)	0,5	10 µM
Betaine	4	5 M
Wasser	9	

Tabelle 15: PCR-Konditionen der Sequenzreaktion.

Temperatur (°C)	Zeit (sek)
98	300
98	40 (30 Zyklen)
50	60 (30 Zyklen)
60	180 (30 Zyklen)

Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA präzipitiert. Dazu wurden 40 µl Wasser, 150 µl 100% EtOH und 6 µl 1,5 M NaOAc/Dextranblau/EDTA-Lösung zum Sequenzreaktionsgemisch hinzupipettiert. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei 11000x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl 70% EtOH aufgenommen und 10 Minuten bei 11000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet komplett getrocknet. Die Sequenzierung der DNA wurde mit der *3130 Genetic Analyzer Sequenzierungsmaschine* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierung beruht auf dem Prinzip nach Sanger

(Sanger et al. 1977). Diese Methode ist auch als Kettenabbruchmethode bekannt. Hier werden außer den konventionellen dNTPs auch noch modifizierte dNTPs (ddNTPs) verwendet, welche durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Polymerisierungsreaktion führen. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. So entstehen DNA-Fragmente von unterschiedlicher Länge, welche dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser sichtbar gemacht werden. Ein Detektor erkennt die Signale und gibt sie in Form eines Elektropherogramms wieder. Die Analyse der Sequenzen wurde mit Hilfe der *SeqScape v2.5*-Software (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.3.10 Genexpressionsanalysen (GEP)

Für genomweite GEP, wurden GFP⁺ L-428-Zellen verwendet, die drei Tage nach der Transduktion mit sh4BATF3 oder shNT sortiert wurden. Die Qualität der RNA wurde mit einem *2100 Bioanalyzer* (Agilent) überprüft. Es wurden drei biologische Replikate der sh4BATF3- und shNT-transduzierten Zellen verwendet. Die Proben liefen auf einer *GeneST2.0* Plattform (Affymetrix, Santa Clara) und wurden mit der *Partek Genomic Suite* (Partek, St. Louis)-Software analysiert. Zur Genset-Anreicherungsanalyse (engl. *gene set enrichment analysis* (GSEA) der Proben wurde die *GSEA2*-Software verwendet (Subramanian et al. 2005).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Je nach Verwendungszweck wurden $0,8 \times 10^5$ bis 5×10^6 Zellen in RIPA-Puffer (Santa Cruz Biotechnologies) lysiert. $0,8 \times 10^5$ Zellen wurden in 20 µl RIPA-Puffer gelöst und 5×10^6 Zellen in 200-400 µl RIPA-Puffer. Der RIPA-Puffer wurde vor Verwendung mit einem Protease Inhibitor Cocktail und einem Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosSTOP; Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben versetzt. Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten gemischt. Anschließend wurden die Lysate bei 4°C und 12000x g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde nach Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.4.2 Herstellung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten

Um nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen aus Zellen zu erhalten, wurde das *Nuclear/ Cytosol Fractionation Kit* (BioVision) verwendet. Hier werden verschiedene Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen sowie verschiedene Zentrifugationsschritte verwendet, um nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen zu separieren.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieses Kit beruht auf der Biuretreaktion bei der Cu^{2+} -Ionen durch Proteine im alkalischen Medium zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden. Der quantitative Nachweis von Proteinen wird dadurch ermöglicht, dass sich aus den einwertigen Kupferionen und der Bicinchoninsäure, welche im Reaktionsgemisch des Kits enthalten sind, ein violetter Farbstoff bildet und diese Reaktion bei einer Wellenlänge von 562 nm messbar ist. Als Referenzstandard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA verwendet. Dabei wurden 10 µl des Standards mit 190 µl des BCA-Reagenz vermischt. 1 oder 2 µl der Proteinprobe wurden mit 199 bzw. 198 µl BCA-Reagenz gemischt und für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm mit einem *BioTek Synergy HAT Microplate reader* und der *KC4-Software* (BioTek Instruments Inc.) gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe der Absorptionswerte der Referenzproteinstandards.

2.4.4 Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP)

Bei der Ko-IP werden Proteine und deren Interaktionspartner aus einem Zelllysat angereichert, indem durch einen spezifischen Antikörper das Zielprotein zuerst markiert wird und dann der Antikörper-Protein-Komplex z.B. mit Hilfe von Protein A/G-Agarose präzipitiert wird. Protein A/G ist ein Fusionsprotein, welches aus den bakteriellen Proteinen A und G stammt und an den konstanten Teil von Antikörpern bindet. Außer dem durch den Antikörper direkt gebundenen Protein können auch dessen Interaktionspartner präzipitiert werden. Die IP wurden auf Grundlage des

Protein A/G PLUS-Agarose Protokolls (Santa Cruz Biotechnology Inc.) durchgeführt. 5×10^6 Zellen wurden in 400 μ l RIPA-Puffer lysiert und anschließend mit 10 μ l Protein A/G-Agarose und 1 μ g Maus IgG-Isotyp-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Aufreinigung und Entfernung von unspezifischen gebundenen Proteinen (engl. *Preclearing*) der Proteinlysate. So bleiben nach einem Waschschrift (2500x g, 5 Minuten) unspezifisch gebundene Proteine als Pellet zurück und der Überstand kann als aufgereinigtes Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Proteinkonzentration wurde nun mittels *Pierce BCA Protein Assay Kit* (siehe 2.4.3) bestimmt. Als „Input“-Kontrolle wurden 40 μ g Protein (10% der Proteinmenge der Ko-IP) verwendet und für den späteren Western-Blot bei -20°C weggefroren. 400 μ g Proteinlysate wurden mit 2 μ g anti-BATF3-, anti-JUN-, anti-JUNB- oder anti-IRF4-Antikörper versetzt und für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 25 μ l Protein A/G-Agarose hinzugefügt und das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat bei 2500x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, welches das Präzipitat enthält, wurde anschließend dreimal in RIPA-Puffer gewaschen. Das Präzipitat, der Überstand und die „Input“-Kontrolle wurden nun für die anschließende Western-Blot-Analyse weiterverarbeitet.

2.4.5 Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ermöglicht es Protein-DNA-Bindungen in lebenden Zellen durch Fixierung mit Formaldehyd festzuhalten und zu untersuchen. Das Zielprotein, welches an eine bestimmte DNA-Sequenz gebunden hat, wird fixiert und anschließend wird die DNA in etwa 200-1000 bp lange Fragmente geschnitten. Mit Hilfe eines Antikörpers, der das Protein von Interesse erkennt, wird der Protein-DNA-Komplex markiert und präzipitiert. Die Fixierung wird wieder aufgehoben und nun kann durch eine quantitative PCR mit *Primern*, die spezifisch für die eine DNA-Region von Interesse sind, der jeweilige genomische Abschnitt nachgewiesen bzw. angereichert werden. Für die ChIP wurden 2×10^6 Zellen mit 1% Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur für 10 Minuten fixiert. Die Kreuzvernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1,25 M Glycine bei Raumtemperatur abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in ChIP-Membran-Lysepuffer

resuspendiert. Das gesamte Chromatin wurde durch Zugabe der *Mikrokokkus* Nuklease (3 Einheiten) fragmentiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Anleitung des *Pierce Agarose ChIP Kits* (Thermo Fisher Scientific). Für die ChIP-Experimente wurden folgende anti-humanen Antikörper in einer 1:100 Verdünnung verwendet: anti-JUN (sc-74543), anti-pSTAT3 (Tyr705), anti-pSTAT5 (Tyr694) und anti-pSTAT6 (Tyr641). Der anti-humane BATF3-Antikörper wurde in einer 1:50 Verdünnung benutzt. Als Kontrollantikörper wurden Maus und Kaninchen IgG benutzt (Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:200).

2.4.6 Western-Blotting

20-30 µg Protein oder mindestens $0,8 \times 10^5$ Zellen wurden für einen Western-Blot verwendet. Die Proteine wurden mit 4x Laemmli-Puffer (Bio-Rad, Hercules) und 1 mM DTT versetzt und für 5 Minuten bei 85°C denaturiert. Zur Auftrennung der Proteine wurden 10%, 12% oder 8-16% Tris-Glycin-Acrylamid-Gele (Bio-Rad) verwendet. Als Laufpuffer wurde ein Tris/Glycine/SDS-Puffer von Bio-Rad verwendet und die Proteine wurden bei 120 Volt für etwa 60 Minuten (je nach Gel) in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran mit dem *iBlot Dry Blotting System* (Invitrogen, Carlsbad) transferiert und es wurde die Einstellung „Programm 4“ für 7 Minuten verwendet. Die benutzten Antikörper und die dazu gehörigen Verdünnungen sind in 2.1.6 zu finden. Als Größenstandard wurden 3 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) und 1 µl *MagicMark XP Western Protein Standard* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Membranen wurden für eine Stunde je nach Antikörper in 4% Milchpulver, 3% BSA oder 3% Fisch-Gelatine (alles in 1x TBST (TBS plus 0,1% Tween-20 gelöst) geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu reduzieren. Anschließend wurde der primäre Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in 1x TBST gewaschen und der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Zur Visualisierung der Antikörper wurde das *ECL Plus Chemilumineszenz Detektionskit* (GE Healthcare, Little Chalfont) und das *Fusion FX7 Detektionssystem* (PeqLab) verwendet. Für die Quantifizierung wurde die Phoretix 1D-Software (PeqLab) verwendet. Hierbei wurden die Intensitäten der Banden des Zielproteins auf die Bandenintensität der Referenzbedingung

normalisiert und dann erfolgte ein weiterer Abgleich auf die Bandenintensität der Ladekontrolle.

2.5 Massenspektrometrie mittels LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie)

Die Vorbereitung der Proben und die anschließende massenspektrometrische Analyse wurden am Medizinischen Proteom-Center an der Ruhr-Universität Bochum in der Arbeitsgruppe von Prof. Barbara Sitek durchgeführt. Massenspektrometrie wurde zur Identifizierung von differentiell exprimierten Proteinen durchgeführt.

2.5.1 Probenvorbereitung und Trypsinverdau

Die Eluate der Ko-IP wurden auf 18% Tris-Glycin-Polycrylamid-Gele geladen (Anamed Elektrophorese, Rodau). Nach etwa 15 Minuten Einlaufzeit der Proben in die Geltaschen bei 100 V wurden die einzelnen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und über Nacht durch Zugabe von Trypsin (Serva Elektrophorese, Heidelberg) in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Extraktion der Peptide durch Zugabe von 20 µl einer 1:1 (v/v) Mischung aus 50% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure und einer 15-minütigen Ultraschallbehandlung. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die Peptide wurden Vakuum-getrocknet und in 0,1% Trifluoressigsäure gelöst. Die RPLC-MS/MS (engl. *reversed phase liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry*)-Analyse wurde auf einen Ultimate 3000 RSLCano System (Thermo Fisher Scientific), welches online an einem Orbitrap Elite Massspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Peptide wurden zuerst in einem Volumen von 15 µl injiziert und mit 0,1% Trifluoressigsäure in einer Trap-Säule für 7 Minuten aufkonzentriert und anschließend mittels einer analytischen Säule über einen 5-40% Acetonitril-Gradienten bei 60°C aufgetrennt. Für das Übersichtsspektrum wurden die Peptidionen über einen Scanbereich von 350-2000 m/z (Masse-zu-Ladung) in der Orbitrap detektiert. Die 20 intensivsten Ionen wurden für die MS/MS und mittels CID (engl. *collision-induced dissociation*) fragmentiert.

2.5.2 Identifikation und Quantifizierung von Peptiden

Die Identifizierung der Peptide wurde mit der *Proteome Discoverer*-Software (Version 1.4.1.14; Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für die weitere Auswertung wurde das *Homo sapiens*-Referenzproteome der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank (Release 2015_11 vom 11.11.2015; 549.832 Einträge) verwendet. Eine tryptische Fehlsplaltung sowie chemische Modifikationen von Methionin (Oxidation) und Cystein (Propionamide) wurden bei der Analyse berücksichtigt. Für Peptide wurde eine *false discovery rate* (FDR) von <1% angewendet. Die Progenesis Q1-Software (Version 2.0.5387.52102, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne) wurde zur Quantifizierung der Peptide (sogenannte „*ion intensity-based label-free quantification*“) benutzt. Zur Berechnung der Proteinhäufigkeiten wurden die normalisierten Ionenintensitäten aller Peptide eines Proteins berücksichtigt. Für differentiell angereicherte Proteine galt als Filterkriterien ein p-Wert von $\leq 0,05$ und eine FC (engl. *fold change*) von $\geq 1,5$.

2.6 Lentivirale Methoden

Die Herstellung und Titrierung von lentiviralen Viruspartikeln, sowie die Infektion von Zelllinien mit den Viruspartikeln, unterliegt den Sicherheitsbestimmungen der Stufe S2.

2.6.1 Produktion von Lentiviren in HEK 293T-Zellen

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden HEK 293T-Zellen mit dem LeGO-Vektor, welcher die Sequenzen für die gewünschte shRNA und einen GFP-Marker enthält, dem pMD2.G-Vektor und den Verpackungsplasmid psPAX2 co-transfiziert. Für die Überexpression von BATF3 wurde der LeGO-iG2-Vektor verwendet, welcher BATF3 und GFP unter Kontrolle des SSFV-Promotors exprimiert (Weber et al. 2008). Der pMD2.G-Vektor kodiert für das lentivirale Hüllprotein (G-Protein) des Vesikular-Stomatits-Virus, während der psPAX2-Vektor die HIV-1 Proteine *gag*, *pol*, *tat* und *rev* unter der Kontrolle eines CAG-Promotors exprimiert. Vor Transfektion wurden die HEK 293T-Zellen durch 5-minütige Inkubation in Trypsin-EDTA (PAN Biotech GmbH) von der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurde FCS zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen für 5 Minuten mit PBS gewaschen. 5×10^6 Zellen

wurden etwa 14-16 Stunden vor der Transfektion in eine 100 mm Petrischale ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium durch serum-freies Medium ersetzt. Es wurden zunächst 500 µl DMEM-Medium mit 30 µl *GeneJuice*-Transfektionsreagenz (Merck Millipore) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. *GeneJuice* enthält kationische Polyamine, welche die Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zelle erleichtern. 5 µg LeGO-, 3,5 µg pMD2.G- und 2 µg psPAX2-Vektoren wurden zu dem *GeneJuice*-Gemisch zugegeben und der Ansatz wurde mehrmals invertiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde der Ansatz tropfenweise zu den HEK 293T-Zellen hinzugegeben. Nach 6-8 Stunden wurde das serum-freie Medium wieder durch FCS-haltiges Medium ersetzt. Die Viruspartikel wurden nach 48 oder 72 Stunden durch einen 0,45 µm großen Filter steril filtriert und bei -80°C weggefroren.

2.6.2 Bestimmung des lentiviralen Titers

Unter der Annahme, dass jede GFP-exprimierende Zelle von einem Viruspartikel infiziert worden ist, lässt sich der lentivirale Titer bestimmen. Hierzu wurde eine bestimmte Menge von HEK 293T-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des lentiviralen Überstandes infiziert. 1×10^5 HEK 293T-Zellen wurden in eine 24-well Platte ausgesät und nach etwa 2 Stunden wurden drei verschiedene Verdünnungen des lentiviralen Überstandes zu den Zellen hinzugegeben (1:250, 1:500, 1:1000 in 500 µl DMEM Medium). Jede Verdünnung wurde in Duplikaten pipettiert und HEK 293T-Zellen ohne Virusüberstand dienten als Negativkontrollen. Drei Tage später wurde der Anteil der GFP⁺-Zellen an einem *FACS Canto*-Durchflusszytometer analysiert. Die Bestimmung des Virustiters basiert auf folgender Formel:

$$T = N \times \frac{P}{V}$$

T: Titer

N: Anzahl der ausgesäten Zellen

V: Volumen des hinzugegebenen Virusüberstand

P: Anteil der transduzierten Zellen

2.6.3 Infektion von Zelllinien

Für die Infektion der Zielzellen wurde ein MOI (engl. *multiplicity of infection*) von 5 verwendet. Der MOI ist definiert als die Anzahl der Viruspartikel pro Zelle, die in einer

Transduktion verwendet werden. Am Tag vor der Transduktion wurden die Zelllinien mit Trypanblau gefärbt, gezählt und in optimaler Konzentration in frischem Medium ausgesät. Zur Transduktion wurden die Zellen zentrifugiert und im Virusüberstand aufgenommen. Zusätzlich wurden 10 µg/ml Polybren zu den Zellen hinzugefügt und es erfolgte die Zentrifugation für 60 Minuten bei 2000x g und 30°C. Als kationisches Polymer neutralisiert Polybren die negative Oberflächenladung der Viren und Zielzellen und erhöht so die Transduktionseffizienz der Zellen (Davis et al. 2004). Abschließend wurde nach etwa 16 Stunden das Medium ersetzt und der Anteil der GFP⁺-Zellen wurde in der Mischkultur alle 3-4 Tage am *FACS Canto* bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 BATF3 aus der AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie ist hoch exprimiert in CD30⁺-Lymphomen

Eine essentielle Funktion der AP-1-Faktoren JUN, JUNB und ATF3 in Lymphomen konnte bereits in einigen Publikationen gezeigt werden (Mathas et al. 2002, Laimer et al. 2012, Blonska et al. 2015, Crescenzo et al. 2015, Juilland et al. 2016). Für den AP-1-Transkriptionsfaktor BATF3 konnte eine erhöhte mRNA-Expression im cHL, PMBL und ALCL nachgewiesen werden (Rosenwald et al. 2003, Savage et al. 2003, Schwering et al. 2003a, Eckerle et al. 2009). Funktionell gibt es bisher allerdings keine Daten zur Rolle von BATF3 in Lymphomen. GEP von verschiedenen B-Zell-Lymphomen und B-Zell-Populationen zeigen ebenfalls eine starke Expression von BATF3 in primären cHL, cHL-Zelllinien und im PMBL (Abbildung 1) (Tiacchi et al. 2012). Die höchste BATF3-Expression ist in HRS-Zellen von primären cHL-Fällen sowie in cHL-Zelllinien zu finden. Im Vergleich zu anderen Lymphomen (BL, FL, DLBCL, NLPBL und TCRBL) zeigt das PMBL ebenfalls erhöhte BATF3-Expression. Zu Beginn dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der BATF3-Ausprägung auf Proteinebene immunhistochemische Färbungen von verschiedenen primären Lymphomen angefertigt (Abbildung 1). Die Immunhistochemie (IHC) wurde am Senckenbergischen Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Die IHC erfolgte durch Dr. Sylvia Hartmann. Für eine Bewertung als BATF3-positiv musste ein Fall in mindestens 50% der Tumorzellen eine Färbung aufweisen. Tatsächlich waren in positiv bewerteten Fällen mind. 80-90% der Tumorzellen positiv und in negativ bewerteten Fällen fast alle Tumorzellen negativ. In der IHC wurde in 21 von 30 (70%) cHL-Fällen und in 8 von 9 (89%) PMBL-Fällen BATF3-Protein detektiert. Eckerle und Kollegen zeigten, dass alle von ihnen analysierten ALCL-Fälle BATF3-Protein ausprägten (Eckerle et al. 2009). Im cHL, PMBL und ALCL sind in der Regel alle Tumorzellen positiv für CD30, aber auch in einem geringen Anteil (10-15%) der DLBCL ist die Ausprägung von CD30 zu beobachten (Hu et al. 2013). Insgesamt waren 18 von 30 (60%) DLBCL positiv für BATF3, jedoch war der Anteil unter den CD30⁺-DLBCL (15/20 Fälle, 75%) signifikant höher als in den CD30-negativen DLBCL (3/10, 30%; Abbildung 1). Die Färbung von

reaktiven Lymphknoten wies eine schwache Färbung in einigen, wenigen blastoiden Zellen innerhalb des GC und in extrafollikulären Bereichen auf.

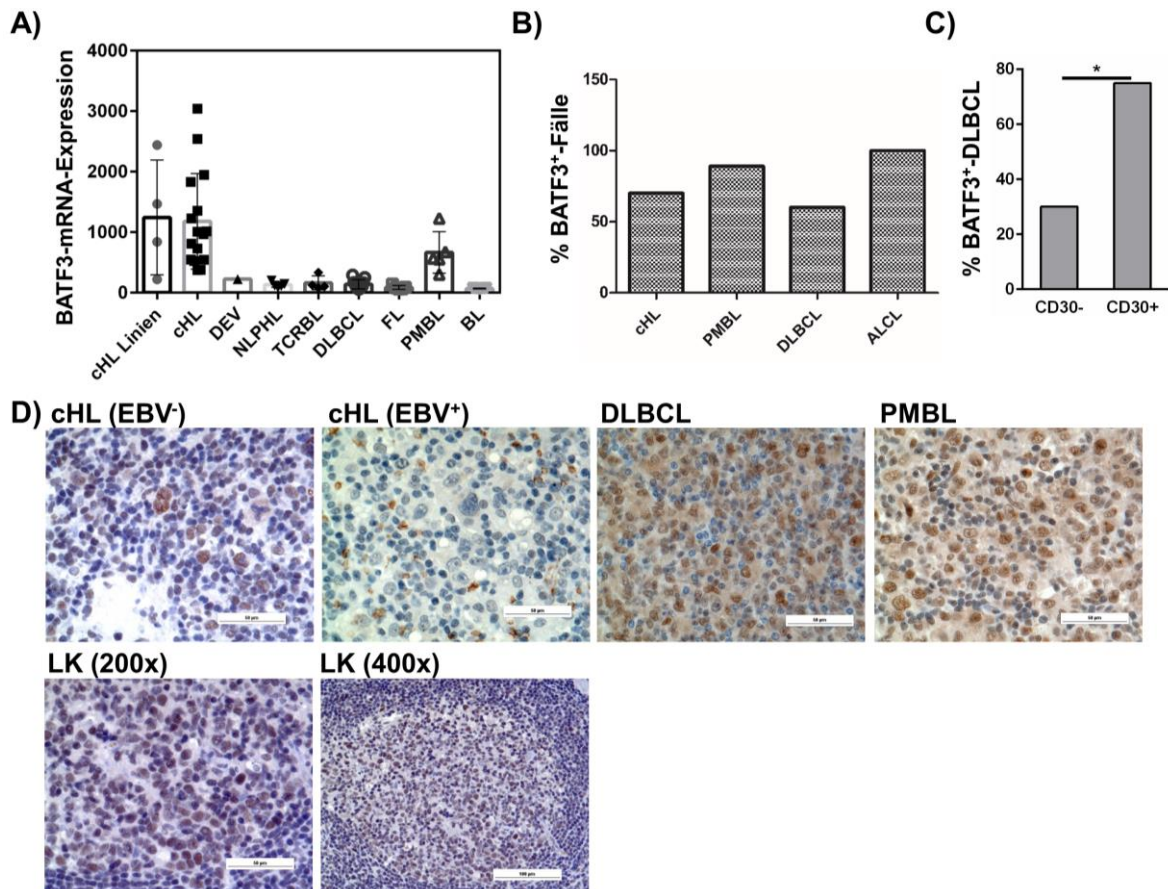


Abbildung 1: BATF3-Expression in Lymphomen. A) Publierte GEP zeigen hohe BATF3-mRNA-Expression im cHL, cHL-Linien und PMBL. NLPHL, TCRBL, DLBCL, FL und BL weisen hingegen keine bis sehr geringe BATF3-Level auf (Tiacci et al. 2012). Balken zeigen die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. B) Übersicht der BATF3-positiven Lymphome nach IHC. 70% der cHL, 90% der PMBL und 60% der DLBCL sind positiv für BATF3. Für das ALCL sind nach Eckerle et al. 2009 100% der Fälle positiv für BATF3. C) Aufteilung der BATF3⁺-DLBCL nach CD30-Status. 75% der CD30⁺-DLBCL sind BATF3-positiv und 30% der CD30⁻-DLBCL. D) HRS-Zellen eines EBV-negativen cHL sind positiv für BATF3. Die IHC von DLBCL und PMBL zeigt BATF3-positiv Zellen in einem Großteil der Tumorzellen. Die Färbung von reaktiven Lymphknoten weist einige wenige BATF3⁺-Zellen auf (verändert nach Lollies et al. 2017).

Zur weiteren Bestätigung der erhöhten BATF3-Expression auf mRNA und Proteinebene im cHL, PMBL und ALCL wurden Proben verschiedener Lymphom-Zelllinien mittels qRT-PCR und Western-Blot analysiert (Abbildung 2). cHL- und ALCL-Zelllinien zeigen dabei die höchsten BATF3-Level auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 2). In der qRT-PCR-Analyse haben die cHL-Zelllinien HDLM-2, KM-H2, L-1236 und L-428 nach Normalisierung zu dem Referenzgen ACTB eine etwa 10- bis 35-fach höhere Menge an BATF3 als die der NLPHL-Zelllinie DEV, die laut GEP Daten geringe BATF3-mRNA-Level aufweist. Die cHL-Linie U-HO1 hingegen hat nur etwa doppelt so viel BATF3-Transkript wie DEV. Die PMBL-Zelllinie

Karpas 1106P zeigt eine doppelt so hohe Menge an BATF3-Transkript und die PMBL-Zelllinie MedB-1 eine 15-fach höhere Menge an BATF3-mRNA. Auffällig ist noch die 5-fach erhöhte BATF3-mRNA-Menge in der ABC-DLBCL-Zelllinie Oci-Ly3. Die beiden ALCL-Zelllinien Karpas 299 und SU-DHL-1 besitzen eine 12- bis 30-fach höhere Menge an BATF3-mRNA. Die GCB-DLBCL-Linien SU-DHL-4 und SU-DHL-6 und die BL-Linien DAUDI und RAJI besitzen keine detektierbaren BATF3-mRNA- und Proteinlevel (Abbildung 2). Die Daten der GEP und die qRT-PCR Analyse zeigen somit stark erhöhte BATF3-mRNA im cHL, ALCL und PMBL.

Die Proteinausprägung von BATF3 in verschiedenen HL- und NHL-Zelllinien wurde mittels Western-Blot analysiert. In allen analysierten cHL-Linien konnte BATF3-Protein deutlich detektiert werden, nicht jedoch in der NLPHL-Linie DEV (Abbildung 2). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten zeigen HDLM-2, L-1236 und L-428 die stärksten Expressionslevel, während U-HO1 die geringste Expression aufweist. Während in KM-H2 die höchsten BATF3-Transkript-Level zu beobachten sind, ist die BATF3-Proteinausprägung im Western-Blot vergleichsweise gering. Des Weiteren wurden noch NHL-Linien auf BATF3-Protein untersucht. Die ALCL-Linien Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1 zeigen ebenfalls starke BATF3-Proteinlevel. Die PMBL-Linien MedB-1 und Karpas 1106P sowie die ABC-DLBCL Zelllinie Oci-Ly3 exprimieren BATF3-Protein (Abbildung 2). Dementsprechend übereinstimmend mit den mRNA-Daten konnte auch eine Proteinexpression in der Oci-Ly3 Zelllinie sowie in den PMBL-Linien nachgewiesen werden. Die GCB-DLBCL- (SU-DHL-4 und SU-DHL-6) und BL-Zelllinien (BL-2, NAMALWA, DAUDI und RAJI) zeigen keine detektierbaren BATF3-Level in der Western-Blot-Analyse. Zusammenfassend ist festzustellen, dass mRNA- und Proteindaten, die mit Hilfe von qRT-PCR, IHC und Western-Blot, generiert wurden, übereinstimmend eine hohe BATF3-Expression in CD30⁺-Lymphomen zeigen (cHL, PMBL, ALCL und CD30⁺-DLBCL).

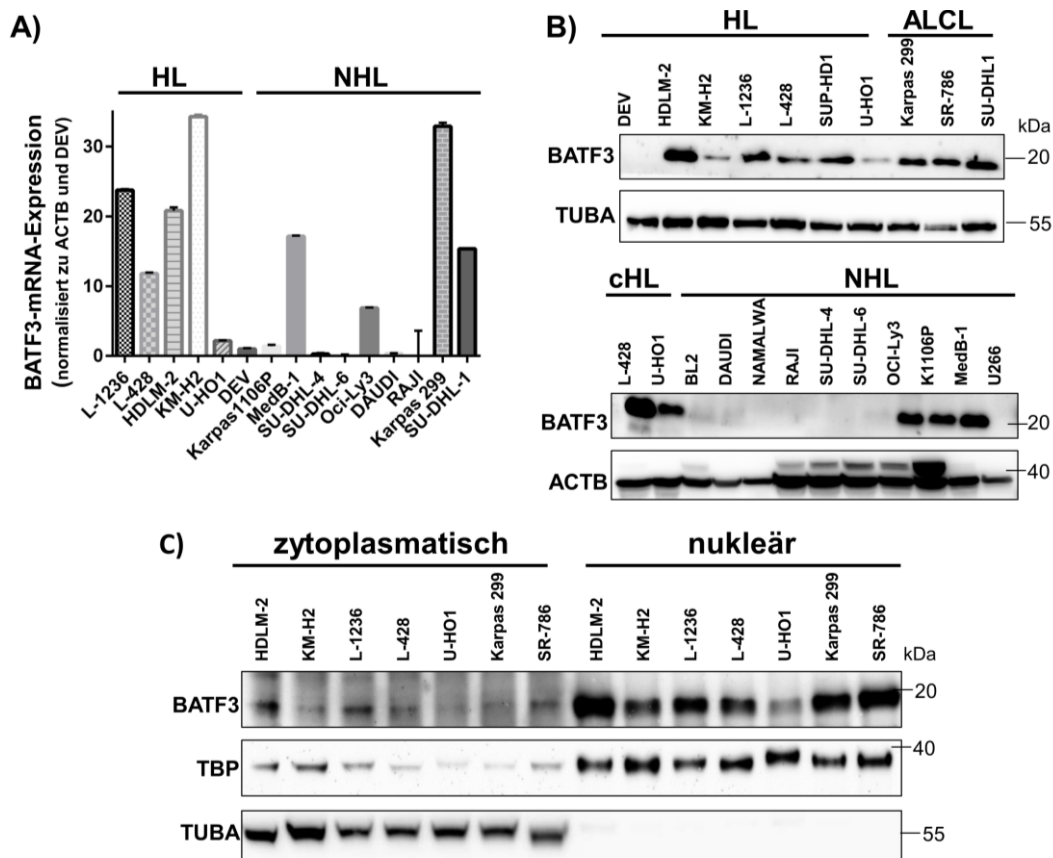


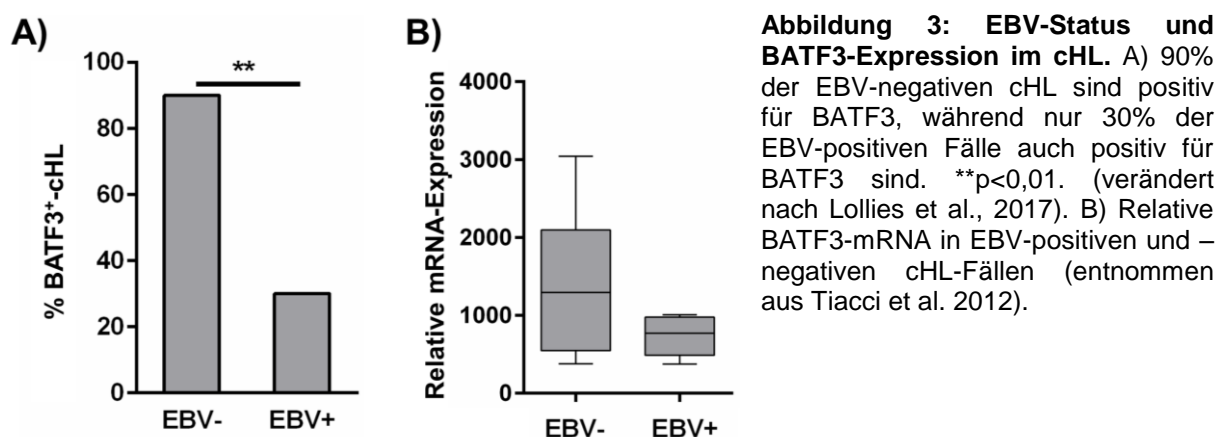
Abbildung 2: BATF3 ist in cHL-, PMBL- und ALCL-Zelllinien stark ausgeprägt. A) Quantitative Analyse der BATF3-Expression in Lymphom-Zelllinien mittels qRT-PCR. Alle analysierten cHL-Linien, ausgenommen der U-HO1, zeigen 10- bis 35-fach höhere mRNA-Level im Vergleich zur NLPBL-Linie, DEV. ALCL-Zelllinien, die PMBL-Linie MedB-1 und die ABC-DLBCL-Linie Oci-Ly3 besitzen ebenfalls hohe BATF3-Level. BATF3-Werte wurden zum Referenzgen ACTB normalisiert. Anschließend erfolgte eine weitere Normalisierung auf DEV ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Balken stehen für die Mittelwerte und Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei technischen Replikaten. B) Die Western-Blot-Analyse von cHL- und ALCL-Linien zeigt hohe BATF3-Expression. Ausnahme ist die NLPBL-Zelllinie DEV, welche keine detektierbaren BATF3-Level besitzt. Als Ladekontrolle wurde TUBULIN (TUBA) verwendet. BATF3-Proteinexpression in NHL-Linien (B unten). Oci-Ly3, Karpas 1106P (K1106P) und MedB-1 prägen BATF3 aus. ACTB diene als Referenzprotein. C) Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen von cHL- und ALCL-Zelllinien. BATF3 ist stark in der nukleären Fraktion angereichert. TATA-box Bindeprotein (TBP) wurde als Kontrolle für die nukleäre Fraktion und TUBA als Kontrolle für die zytoplasmatische Fraktion verwendet. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

Da ein aktiver Transkriptionsfaktor zur Regulation der Transkription an DNA-Sequenzen bindet und daher im Zellkern lokalisiert ist, ist aktives BATF3 im Zellkern zu erwarten. Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von BATF3, wurden nukleäre und zytoplasmatische Proteinfractionen von cHL- und ALCL-Linien getrennt analysiert. Die Separation wurde mittels TBP und TUBA für die nukleären bzw. zytoplasmatischen Fraktionen geprüft. Die Western-Blot-Analyse zeigt eine erfolgreiche Auftrennung der beiden Fraktionen, da sich TUBA fast ausschließlich in der zytoplasmatischen und TBP in der nukleären Fraktion befinden (Abbildung 2). In

allen cHL- und auch in den ALCL-Linien Karpas 299 und SR-786 ist eine starke BATF3-Bande in der Kernfraktion zu sehen, während die zytoplasmatischen Fraktionen nur geringe BATF3-Level aufweisen. BATF3 befindet sich in diesen Zelllinien also überwiegend im Zellkern. Es konnte hiermit erstmals die starke Ausprägung von BATF3-Protein in HRS-Zellen von primären cHL-Fällen als auch in cHL-Zelllinien nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit Eckerle et al. ist BATF3 ebenfalls in ALCL-Zelllinien sehr stark exprimiert. Darüber hinaus zeigen die IHC von PMBL- und CD30⁺-DLBCL-Fällen und die Western-Blot-Analysen von PMBL-, cHL- und ALCL-Linien, dass BATF3-Ausprägung ein Merkmal von CD30⁺-Lymphomen ist.

3.2 Korrelation zwischen EBV-Status und BATF3-Expression in cHL

Etwa 40% der cHL sind positiv für EBV (Mathas et al. 2016). Eine Analyse publizierter GEP-Daten von primären HRS-Zellen zeigt im Mittel eine etwa 2-fach stärkere BATF3-mRNA-Expression in EBV-negativen Fällen im Vergleich zu EBV-positiven cHL (Tibaldi et al. 2012). Aus diesem Grund wurden ebenfalls die immunhistochemisch gefärbten cHL-Fälle auf ihren EBV-Status untersucht. Die Erkennung von EBV-infizierten Lymphomen erfolgte mittels einer LMP1-Färbung. Hier ist allerdings zu beachten, dass das nodulär-sklerosierende cHL viel seltener mit EBV infiziert ist als das gemischt-zellige cHL (Engert et al. 2011).



Von den 30 gefärbten cHL-Fällen sind 90% der EBV-negativen Fälle positiv für BATF3, hingegen wurden nur 30% der EBV-positiven Fälle auch positiv für BATF3

bewertet (Abbildung 3). Der EBV-Status der BATF3-gefärbten DLBCL wurde ebenfalls analysiert. Laut IHC sind unter den EBV-positiven CD30⁺-DLBCL 6 von 10 (60%) positiv für BATF3, wohingegen 9 von 10 der EBV-negativen CD30⁺-DLBCL positiv für BATF3 sind (Tabelle 16). So lässt sich im DLBCL eine leichte Tendenz erkennen, dass EBV-negative DLBCL auch etwas häufiger positiv für BATF3 sind. Allerdings sind die Fallzahlen hier zu klein, um genauere Aussagen zwischen EBV-Status und BATF3-Ausprägung im DLBCL machen zu können. Für das cHL lässt sich allerdings eine deutliche inverse Korrelation zwischen BATF3-Positivität und EBV-Negativität feststellen, da 90% der EBV⁻-cHL-Fälle BATF3 ausprägen und nur 30% der EBV⁺-cHL-Fälle auch positiv für BATF3 sind.

Tabelle 16: Übersicht der BATF3-gefärbten Lymphome mittels IHC. Außer der BATF3-Färbung wurde ebenfalls der EBV-Status und im Falle der DLBCL der CD30-Status analysiert.

Lymphom	Status	BATF3 ⁺ / Anzahl Fälle (%)
cHL	EBV ⁺ (alle gemischt-zellige cHLs)	3/10 (30)
	EBV ⁻ (10 gemischt-zellige und 10 nodulär-sklerosierende cHLs)	18/20 (90)
	Gesamt	21/30 (70)
PMBL		8/9 (89)
DLBCL	CD30 ⁻	3/10 (30)
	CD30 ⁺ EBV ⁻	9/10 (90)
	CD30 ⁺ EBV ⁺	6/10 (60)

3.3 BATF3-Expression in humanen tonsillären B-Zell-Populationen

Das parallele Auftreten von CD30 und BATF3 in Lymphomen, weckt die Frage, ob BATF3 auch in „normalen“ CD30⁺-Lymphozyten exprimiert ist. Die Analyse publizierter GEP von verschiedenen B- und T-Zell-Populationen zeigt eine erhöhte BATF3-Expression in CD30⁺-B- und T-Lymphozyten (Eckerle et al. 2009, Tiacci et al. 2012). So besitzen CD30⁺-GC-B-Zellen im Vergleich zu anderen CD30⁻-B-Zell-Subtypen (naive B-Zellen, GC-B-Zellen, Gedächtnis- und Plasmazellen) eine etwa 5-fach höhere BATF3-Ausprägung (Abbildung 4). Die CD30⁺ extrafollikulären B-Lymphozyten zeigen sogar 8-fach höhere BATF3-mRNA-Level im Vergleich zu

CD30⁺-B-Zell-Subtypen. CD30⁺-T-Lymphozyten haben im Vergleich zu ruhenden und aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen etwa 1,5-fach höhere BATF3-mRNA-Expression. Zur Validierung der publizierten GEP der erhöhten BATF3-Ausprägung in CD30⁺-B-Lymphozyten, wurden zunächst mononukleäre Zellen aus Tonsillen mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und CD30⁺-B-Zellen mittels MACS angereichert, da diese nur etwa 1% der PMBCs ausmachen (persönliche Kommunikation Dr. Marc Weniger und Dr. Stefanie Schneider). Für die Analyse wurden CD30⁺CD20⁺CD38^{hi}-GC- und CD20⁺CD38⁺CD30⁺-Nicht-GC-B-Zellen sowie CD30⁺CD20^{hi}CD38⁺-GC-, CD20⁺CD38⁺CD27⁺-Gedächtnis- und CD20⁺CD38^{hi}-Plasmazellen sortiert. In den CD30⁺-B-Lymphozyten konnte im Vergleich zu den Gedächtnis-, Plasma- und GC-Zellen eine erhöhte BATF3-mRNA-Expression mittels qRT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 4). Die AP-1-Faktoren JUN und FOS wurden als Positivkontrolle für die Plasmazellfraktion verwendet. Es wurde keine Normalisierung auf ACTB vorgenommen, da die verschiedenen B-Zell-Populationen ACTB unterschiedlich stark regulieren (beobachtet von und kommuniziert mit Dr. Marc Weniger). Um die Expression dennoch vergleichen zu können, wurde stattdessen pro Reaktion cDNA äquivalent zu 500 Zellen je Reaktion eingesetzt. Die Analyse normaler B-Zell-Populationen macht deutlich, dass eine kleine Zell-Population, die der CD30⁺-B-Lymphozyten, relativ hohe BATF3-Transkriptlevel aufweist, hingegen zeigt der Großteil der B-Zell-Populationen keine oder nur sehr geringe BATF3-mRNA-Level.

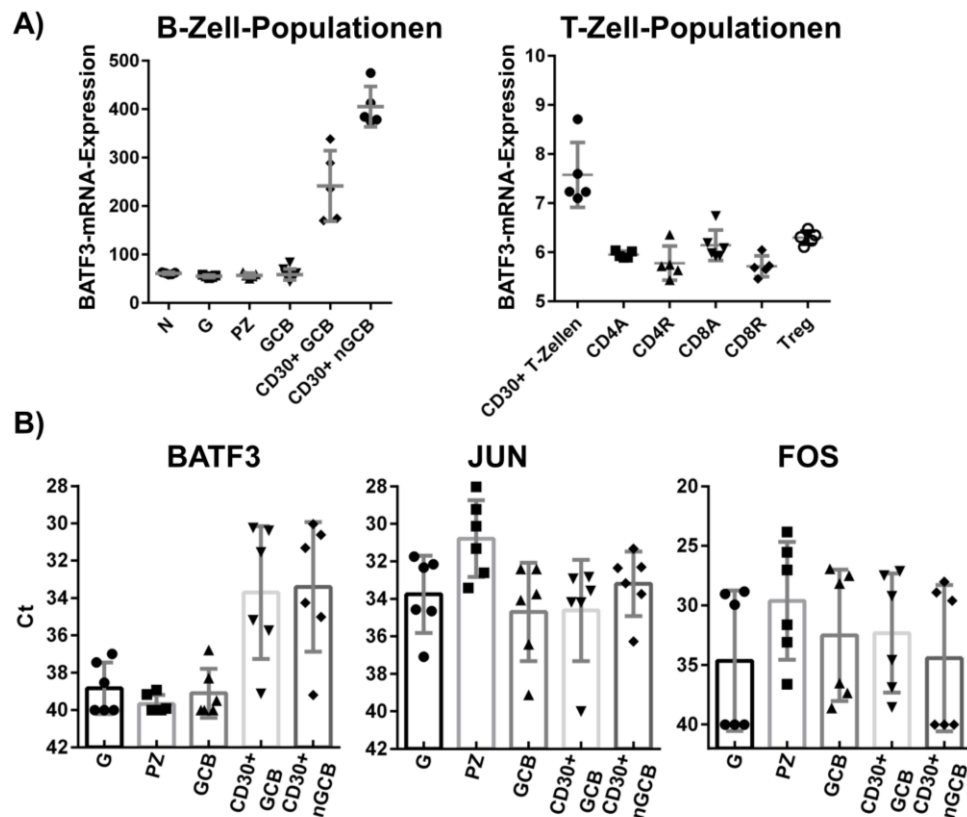


Abbildung 4: BATF3-Expression in humanen Lymphozyten. A) Expression von BATF3-mRNA in B- und T-Zell-Populationen. Stark erhöhte BATF3-Transkript-Level sind in CD30⁺-B-Zellen zu detektieren (verändert nach Tiacchi et al. 2012). In CD30⁺-T-Zellen ist BATF3-mRNA ebenfalls stark ausgeprägt im Vergleich zu CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (verändert nach Eckerle et al., 2009). N – Naive B-Zellen; G – Gedächtnis-B-Zellen; PZ – Plasmazellen; GCB – GC-B-Zellen; nGCB– Nicht-GC-B-Zellen; A – aktiviert; R – ruhend. B) B-Zell-Populationen aus tonsillärem Gewebe wurden sortiert und auf BATF3-, JUN- und FOS-Expression untersucht. CD30⁺-B-Lymphozyten zeigen eine erhöhte BATF3-Ausprägung im Vergleich zu CD30⁻-B-Zell-Populationen. Dargestellt sind die Ct-Werte nach qRT-PCR. JUN und FOS wurden als positive Kontrolle für die Plasmazellfraktion verwendet. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.4 Ausprägung von AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren in humanen Lymphomen

AP-1-Proteine bilden heterodimere Transkriptionsfaktoren, z.B. aus JUN und FOS Mitgliedern, und auch BATFs dimerisieren mit JUN Proteinen, wie in murinen Lymphozyten gezeigt werden konnte (Glasmacher et al. 2012, Li et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). In der Western-Blot-Analyse zeigen cHL- und ALCL-Zelllinien eine konsistente Proteinexpression von JUN und JUNB (Abbildung 5). Die cHL-Linien HDLM-2, KM-H2, L-428 und SUP-HD1 weisen hohe JUN- und JUNB-Level auf im Vergleich zu L-1236 und U-HO1, in denen die Proteinausprägung von JUN und JUNB moderat ist. In den ALCL-Linien sind für JUNB noch stärkere Banden als in den cHL-Zelllinien nachzuweisen. JUN ist in allen ALCL-Linien etwa so stark wie in

den cHL-Linien ausgeprägt. Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse weiterer NHL-Zelllinien keine detektierbare Expression von JUN oder JUNB in PMBL-, BL- und GCB-DLBCL-Linien mit einer Ausnahme. Sowohl JUN- als auch JUNB-Protein werden von der ABC-DLBCL-Linie Oci-Ly3 ausgeprägt.

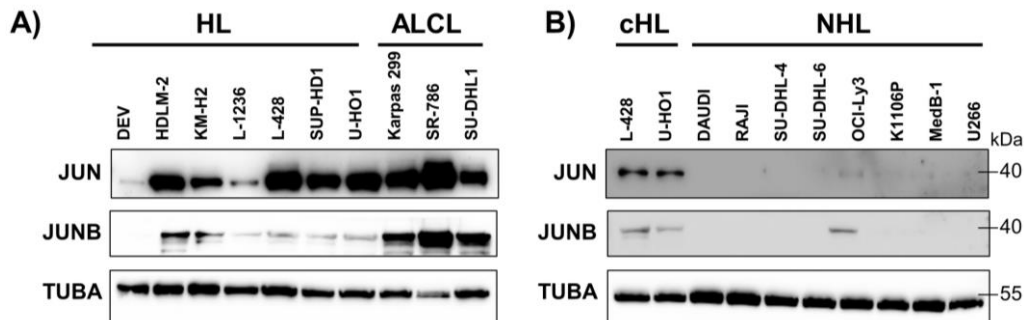


Abbildung 5: Ausprägung von JUN und JUNB in cHL- und NHL-Linien. A) ALCL- und cHL-Zelllinien exprimieren JUN und JUNB. B) In NHL-Linien ist eine schwache Ausprägung von JUN und JUNB in der Oci-Ly3-Zelllinie festzustellen. Als Ladekontrolle wurde TUBA verwendet. Es wurden zwei biologische Replikate der beiden Western-Blots durchgeführt. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

Ursprünglich wurden BATFs als Transkriptionsfaktoren charakterisiert, die eine reprimierende Wirkung auf die Transkription besitzen (Aronheim et al. 1997, Echlin et al. 2000). Zudem unterstützte das Fehlen einer transaktivierenden Domäne die These der transkriptionellen Repression durch BATFs. Aktuellere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass BATFs mit IRFs interagieren und als positive Regulatoren der Gentranskription fungieren (Glasmacher et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). Verschiedene Studien haben eine wichtige Funktion von IRF4 und IRF5 im cHL und ALCL beschrieben. Beispielsweise haben Studien von Kreher et al. veranschaulicht, dass IRF5 zusammen mit NF κ B an der Ausprägung des cHL-spezifischen Phänotyps beteiligt ist (Kreher et al. 2014). Darüber hinaus ist IRF4 als essentieller Transkriptionsfaktor im ALCL beschrieben und die Herunterregulation von IRF4 hat toxische Effekte auf ALCL-Zelllinien und in ALCL Xenograft-Mausmodellen (Weilemann et al. 2015). Aus diesem Grund wurde die Expression von IRFs in cHL- und NHL-Linien untersucht. Western-Blot-Analysen zeigen eine starke Ausprägung von IRF4 und IRF5 in cHL-, ALCL- und PMBL-Linien (Abbildung 6). In den NHL-Zelllinien Oci-Ly3 und BL2, der MM-Linie U266 sowie den beiden PMBL-Linien K1106P und MedB1 ist IRF4- und IRF5-Protein exprimiert. IRF8 ist in cHL- und ALCL-Linien kaum ausgeprägt, hingegen besitzen die DLBCL-Linien Oci-Ly3, SU-

DHL-4 und SU-DHL-6, die BL-Linie RAJI und die PMBL-Linie Karpas 1106P starke IRF8-Expression (Abbildung 6).

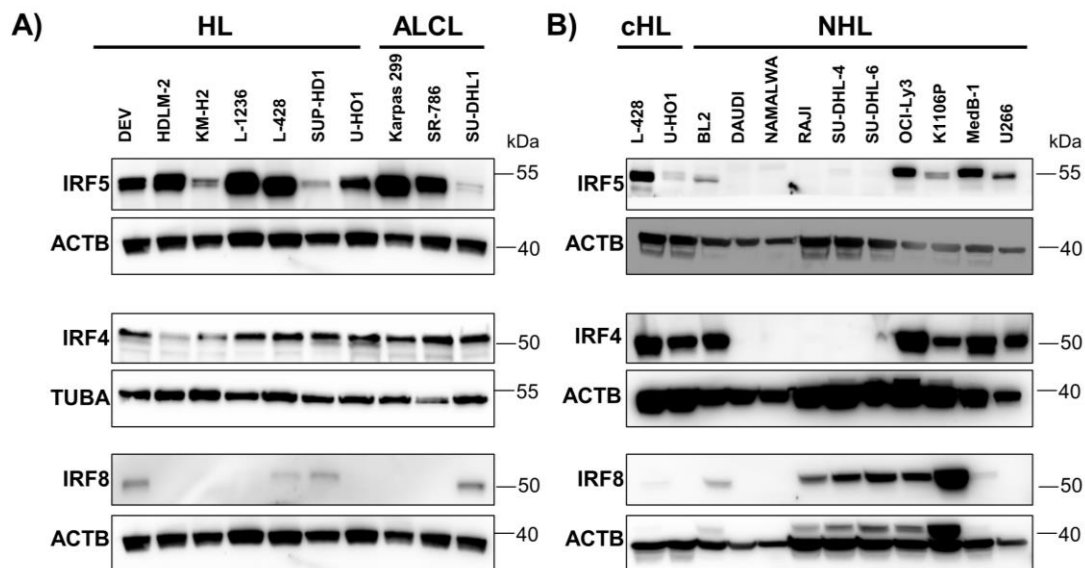


Abbildung 6: Expression von IRFs in HL- und NHL-Linien. A) HL- und ALCL-Zellen prägen IRF4 und IRF5 stark aus. IRF8 ist nur in den cHL-Linien HDLM-2, L-428 und SUP-HD1 und der ALCL-Linie SU-DHL-1 schwach exprimiert. B) In NHL-Zellen sind IRF4 und IRF5 in der BL-Linie BL2, der DLBCL-Linie Oci-Ly3, den beiden PMBL-Linien K1106P und MedB-1 und der MM-Linie U266 zu detektieren. IRF8 ist in den BL-Linien BL2 und RAJI, allen drei DLBCL- und den beiden PMBL-Zelllinien ausgeprägt. ACTB oder TUBA wurden als Ladekontrolle eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot von mindestens zwei biologischen Replikaten. Die Größe des Proteinmarkers ist angegeben in kDa.

3.5 Identifizierung von BATF3-Interaktionspartnern

Der AP-1-Transkriptionsfaktor JUN wurde als Interaktionspartner von BATF3 (damals noch als SNFT bzw. p21SNFT beschrieben) in der T-ALL-Zelllinie Jurkat charakterisiert (Iacobelli et al. 2000). In cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien sind die Interaktionspartner von BATF3 bisher nicht bekannt. Zur Identifizierung potentieller und auch unbekannter Interaktionspartner von BATF3 im cHL, wurde in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Barbara Sitek von der Ruhr-Universität Bochum eine massenspektrometrische Analyse von BATF3-Immunpräzipitaten durchgeführt. Für die IP wurden Proteinlysate von 5×10^6 Zellen der cHL-Linie L-428 hergestellt. Es wurde ein IgG2a-Antikörper zur Kontrolle verwendet, da der anti-humane BATF3-Antikörper ebenfalls vom IgG2a-Isotyp ist. Mit dieser Isotyp-Kontrolle sollen unspezifisch von BATF3-spezifisch angereicherten Proteinen unterschieden werden. Es wurden fünf biologische Replikate der IP für eine statistische Analyse hergestellt. Eine Übersicht der Interaktionspartner, die signifikant in allen fünf Replikaten im

Vergleich zur Isotyp-Kontrolle im BATF3-Immunpräzipitat angereichert waren, ist in Tabelle 17 dargestellt ($FC \geq 1,5$ und $p\text{-Wert} \leq 0,05$). BATF3 konnte am stärksten angereichert werden und bestätigt die erfolgreiche IP. Das NUCKS-Protein, ein Casein und Cyclin-abhängiges Kinase Substrat, ist etwa 50-fach und SPCS2, eine Untereinheit des Signal-Peptidase-Komplexes, etwa 28-fach angereichert worden. Eine 17-fache Anreicherung für GAK8, eine 10-fache Anreicherung von DCXR und eine 7-fache Anreicherung von CLU, sind noch im Präzipitat von BATF3 zu detektieren. Das erste AP-1-Protein, das signifikant mit BATF3 immunpräzipitiert werden konnte, ist JUN mit einer 5,3-fachen Anreicherung. Bei der weiteren Analyse der nicht-signifikant angereicherten Proteine des BATF3-Immunpräzipitats fällt noch JUNB mit einer etwa 8-fachen Anreicherung, JUND mit einer etwa 3,4-fachen Anreicherung sowie IRF4 mit einer 1,4-fachen und IRF5 mit einer 1,3-fachen Anreicherung auf.

Tabelle 17: Proteine, die im BATF3-Immunpräzipitat signifikant angereichert sind. Massenspektrometrie konnte 25 Proteine im Präzipitat von BATF3 identifizieren. IgG2a diente als Isotyp-Kontrolle. Fünf biologische Replikate wurden für die statistische Auswertung analysiert. Dargestellt sind Proteine mit einem FC von $\geq 1,5$ und einem p-Wert von $\leq 0,05$.

Identifikationsnummer (UniProt Datenbank)	Gensymbol	Maximaler FC
Q9NR55	BATF3	76,85
Q9H1E3	NUCKS	49,51
Q15005	SPCS2	27,80
Q9HDB9	GAK8	17,43
Q7Z4W1	DCXR	10,53
O75153	CLU	7,21
P05412	JUN	5,31
P55160	NCKPL	4,30
P61803	DAD1	2,95
Q8IWZ3	ANKH1	2,27
Q9P265	DIP2B	1,97
Q9NZ08	ERAP1	1,90
P30153	2AAA	1,87
P62249	RS16	1,86
Q9H0B6	KLC2	1,84
P18858	DNLI1	1,70
O94776	MTA2	1,68
P40818	UBP8	1,68
Q9UKV3	ACINU	1,65
Q93009	UBP7	1,64
Q9Y613	FHOD1	1,62

Identifikationsnummer (UniProt Datenbank)	Gensymbol	Maximaler FC
P48960	CD97	1,57
Q9H2V7	SPNS1	1,57
P07814	SYEP	1,56
P46777	RL5	1,53

Die in der cHL-Zelllinie L-428 gefundenen Interaktionspartner von BATF3 sollten nun validiert und die Interaktion mit anderen AP-1 und IRFs in cHL- und ALCL-Linien näher untersucht werden. Hierzu wurden IP von BATF3, JUN und JUNB mit entsprechenden Isotyp-Kontrollen in cHL- und ALCL-Zelllinien durchgeführt. Ein Aliquot des Gesamtzelllysates vor der Präzipitation dient in der anschließenden Western-Blot-Analyse als sogenannte „Input“-Kontrolle. BATF3, JUN und JUNB wurden in den beiden cHL-Zelllinien, HDLM-2 und L-428, und den beiden ALCL-Zelllinien, Karpas 299 und SR-786, erfolgreich präzipitiert. Die erfolgreiche IP ist in der deutlichen Bande für BATF3 im BATF3-Immunpräzipitat, für JUN im JUN-Immunpräzipitat und für JUNB im JUNB-Immunpräzipitat erkennbar (Abbildung 7). Bei der HDLM-2 cHL-Linie ist im BATF3-Immunpräzipitat neben den starken Banden für BATF3 ebenfalls eine starke Bande für JUNB und eine schwache Bande für JUN erkennbar. JUN und JUNB konnten also mit BATF3 präzipitiert werden. Im JUN-Immunpräzipitat sind ebenfalls BATF3 und JUN detektierbar. Ein Signal für BATF3 ist im JUNB-Immunpräzipitat zu finden, allerdings ist für JUN kein Signal detektierbar. Die IP von L-428, SR-786 und Karpas 299 verhalten sich sehr ähnlich zu denen von HDLM-2. Ein Unterschied ist hier allerdings die sehr viel stärkere Bande für BATF3 in der JUNB-Präzipitation in L-428, Karpas 299 und SR-786. Des Weiteren ist im JUN-Immunpräzipitat von L-428 und den beiden ALCL-Linien eine stärkere Bande für JUNB zu sehen, was im JUN-IP der HDLM-2-Zelllinie nicht der Fall ist.

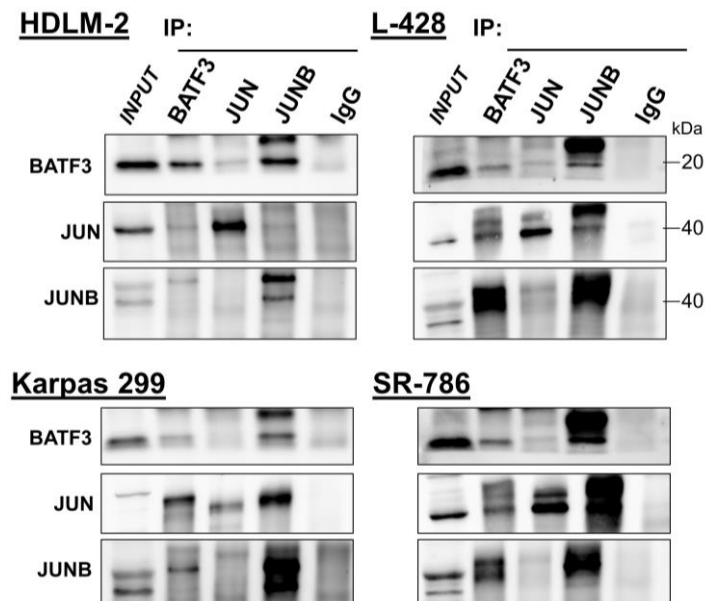


Abbildung 7: JUN und JUNB sind Interaktionspartner von BATF3. In cHL- und ALCL-Zellen können JUN und JUNB im BATF3-Präzipitat nachgewiesen werden. Ebenfalls ist BATF3 stark im JUNB-Präzipitat und leicht im JUN-Präzipitat angereichert. Als Isotyp-Kontrolle wurde IgG und als „Input“-Kontrolle Gesamtzellextrakt verwendet. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017). IP – Immunpräzipitation.

Da BATFs mit IRFs Komplexe bilden können (Murphy et al. 2013) und in der massenspektrometrischen Analyse des BATF3-Immunpräzipitats IRF4 leicht angereichert vorzufinden ist, wurde das IRF4-Proteinlevel nach BATF3-IP angeschaut. Für IRF4 konnte im BATF3-Präzipitat von L-428 und SR-786 keine Bande detektiert werden, allerdings wurde ein deutliches Signal im Überstand der Zelllysate sichtbar (Abbildung 8), was darauf hindeutet, dass IRF4 unter diesen Versuchsbedingungen nicht mit BATF3 präzipitiert. Eine mögliche Interaktion kann aber grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, da die Interaktion von IRFs mit AP-1-Komplexen nur über eine schwache Bindung von drei Aminosäuren stattfindet (Tussiwand et al. 2012). So könnte das hier angewandte Protokoll der Präzipitation ungeeignet für eine derart schwache Interaktion sein, indem durch das mehrmalige Waschen des Präzipitats mit RIPA-Puffer mögliche Komplexe gelöst werden könnten. Zusammenfassend konnte mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse und der anschließenden IP von BATF3, JUN und JUNB gezeigt werden, dass BATF3 mit JUN sowie JUNB Komplexe in cHL- und ALCL-Zelllinien bildet.

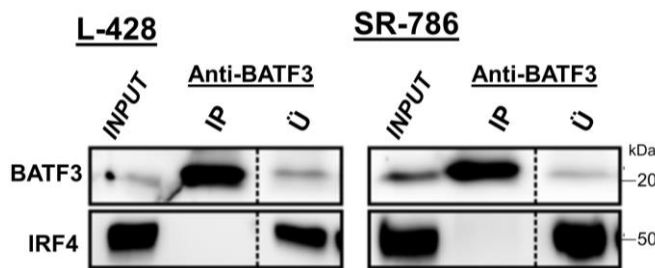


Abbildung 8: IRF4 ist nicht im BATF3-Immunpräzipitat zu detektieren. IRF4 ist nur im Überstand (Ü) von L-428 und SR-786 zu finden. Zur Überprüfung der erfolgreichen BATF3-IP wurde ebenfalls ein Western-Blot von BATF3 durchgeführt. Zwei biologische Replikate wurden pro Zelllinie angefertigt. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.6 Herunterregulation von BATF3 durch shRNA-vermittelten lentiviralen Gentransfer

Da bis zum Beginn dieser Dissertation nichts über die Funktion von BATF3 in CD30⁺-Lymphomen bekannt war, sollte die Funktion von BATF3 im cHL, ALCL und PMBL näher untersucht werden. Aus diesem Grund wurden lentivirale shRNA-Vektoren zur Herunterregulation von BATF3 hergestellt. Zu Beginn wurden vier verschiedene Oligonukleotide entworfen, die zur mRNA von BATF3 komplementär sind und als shRNA zur Herunterregulation von BATF3 fungieren sollten (Abbildung 9). Als Kontrolle wurde ein sogenanntes shNT-Oligonukleotid (engl. *non-target*, NT) verwendet, welches zu keiner humanen mRNA komplementär ist und dazu dient, unspezifische Effekte der lentiviralen Transduktion zu erkennen bzw. ausschließen zu können.

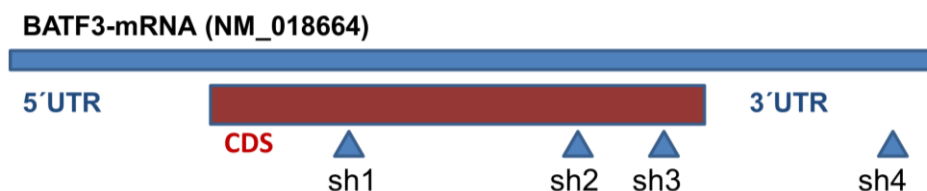


Abbildung 9: Schematische Darstellung der shRNA-Bindestellen in der BATF3-mRNA. Drei der vier shRNA, die zur Herunterregulation von BATF3 hergestellt wurden, binden in der CDS von *BATF3*. Die vierte shRNA bindet in einem Bereich der 3'UTR in der BATF3-mRNA. CDS – kodierende DNA-Sequenz; UTR – untranslatierte Region.

Die erfolgreich transduzierten Zelllinien wurden durch ihre GFP-Expression identifiziert und zunächst wurden von den GFP⁺-sortierten Zellen Proteinlysate hergestellt, um die Herunterregulation von BATF3 im Western-Blot zu kontrollieren. Je nach Zelllinie wurden dafür 0,8–2x10⁵ Zellen verwendet. In der ersten Transduktion der cHL-Linien L-1236 und L-428 regulieren sh1BATF3 und sh4BATF3 die Expression von BATF3 sehr effizient herunter und wurden für die weiteren Experimente verwendet. Eine weniger effiziente Herunterregulation von BATF3 wird

durch sh2BATF3 erreicht, während sh3BATF3 keinen sichtbaren Effekt zeigt, aus welchem Grund diese für weitere funktionelle Analysen ausgeschlossen wurden.

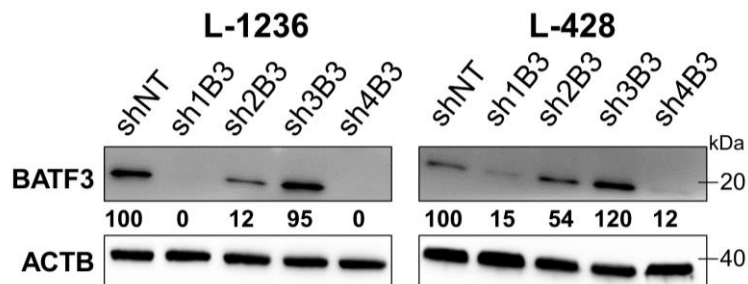


Abbildung 10: Überprüfung der Herunterregulation von BATF3 durch vier spezifische shRNAs. L-1236 und L-428 wurden mit vier shRNAs gegen BATF3 oder einer Kontroll-shRNA ohne Zielsequenz (shNT) infiziert und 3 Tage nach Infektion sortiert. Im Vergleich zur Kontrolle wird die stärkste Herunterregulation bei sh1BATF3- und sh4BATF3-transduzierten Zellen erreicht. Zellen, die mit sh2BATF3 transduziert wurden, zeigen eine geringe Herunterregulation von BATF3, während sh3BATF3-transduzierte Zellen keine veränderten BATF3-Proteinlevel aufweisen. Der prozentuale Anteil von BATF3-Protein ist nach Normalisierung auf die Ladekontrolle ACTB und die shNT-transduzierte Probe dargestellt. Die Größe des Proteinmarkers ist angegeben in kDa. shNT – shnontarget; B3 –BATF3.

Im Vergleich zur shNT-transduzierten Kontrolle zeigen alle analysierten Zelllinien stark reduzierte bis nicht mehr detektierbare BATF3-Proteinlevel. Die Proteinexpression wurde mit der *Phoretix 1D*-Software quantifiziert und die BATF3-Expression wurde auf ACTB und shNT-Kontrolle normalisiert. Die Western-Blot-Analysen der shRNA-transduzierten cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien sind in Abbildung 11 dargestellt. Die BATF3-Proteinexpression wird in cHL- und ALCL-Linien mit beiden shRNAs um mindestens 70% gesenkt. Nur in der cHL-Linie U-HO1 sowie in der PMBL-Linie MedB-1 können die BATF3-spezifischen shRNAs die Proteinexpression nicht effizienter als 60% in U-HO1 Zellen bzw. 45% in MedB-1 Zellen herunterregulieren. Beim Vergleich der beiden shRNAs scheint die Reduktion der BATF3-Expression im Allgemeinen mit sh1BATF3 geringfügig effizienter als mit sh4BATF4.

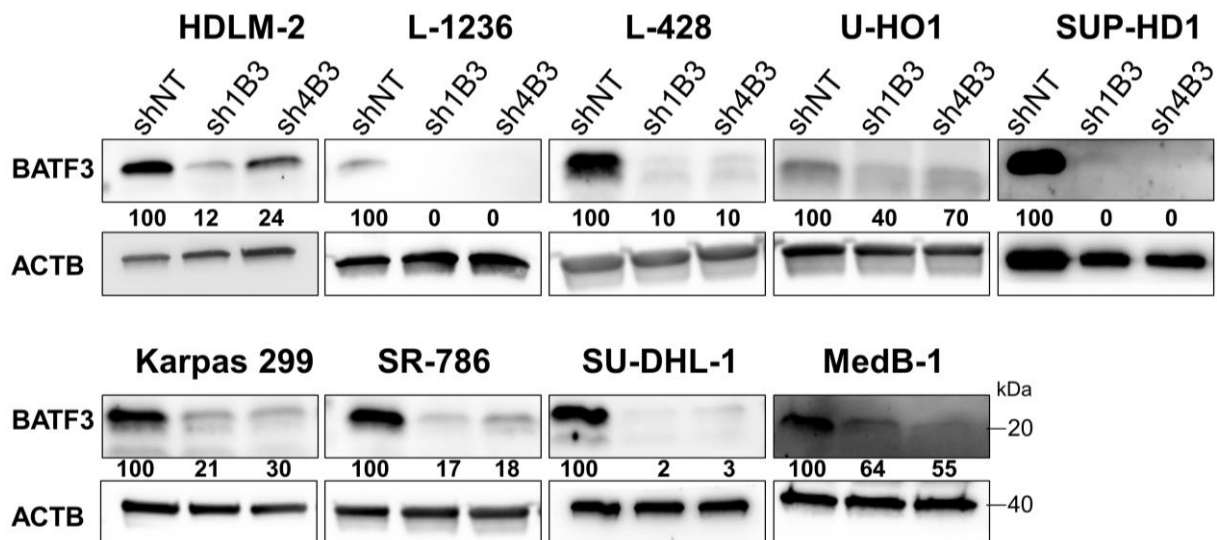


Abbildung 11: BATF3-Herunterregulation durch shRNA-vermittelte lentivirale Transduktion. Die cHL-Linien HDLM-2, L-1236, L-428, U-HO1 und SUP-HD1, die ALCL-Linien Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1 und die PMBL-Zelllinie MedB-1 zeigen stark reduzierte BATF3-Proteinlevel nach Transduktion mit zwei verschiedenen shRNAs gegen BATF3. GFP-positive Zellen wurden 3-4 Tage nach Infektion sortiert und auf BATF3-Ausprägung mittels Western-Blot untersucht. Der prozentuale Anteil von BATF3-Protein ist nach Normalisierung auf ACTB und die shNT-transduzierte Kontrollprobe dargestellt. Die Größe des Proteinmarkers ist angegeben in kDa. Es wurden mindestens zwei biologische Replikate pro Zelllinie durchgeführt (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.7 Effekt auf das Wachstum von ALCL-, cHL- und PMBL-Zelllinien nach BATF3-Herunterregulation

Die Zelllinien wurden nach der Infektion mit shRNA-enthaltenden Viruspartikeln alle 3-4 Tage durchflusszytometrisch analysiert, um den Anteil GFP-positiver, transduzierter Zellen in der Mischkultur zu bestimmen. Bei zell-intrinsischen, nachteiligen physiologischen Effekten, z.B. auf Proliferation und/oder Überleben der Zellen, ist eine Abnahme der GFP-positiven Population über den Messzeitraum zu erwarten. Die transduzierten Zelllinien wurden 3-4 Wochen kultiviert und beobachtet. Für die Ergebnisauswertung wurde jeder Messwert zu dem ersten Wert (Tag 3) und der shNT-transduzierten Kontrolle normalisiert.

Die shBATF3-transduzierten cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 zeigen alle einen Wachstumsnachteil mit beiden shRNAs, sh1BATF3 und sh4BATF3 (Abbildung 12). Nach 21 Tagen ist die Fraktion GFP-positiver Zellen in sh1BATF3-transduzierten cHL-Zelllinien auf 40-60% des anfänglichen Anteils an der Kultur reduziert. Mit einer Reduktion auf 20-40% zeigen die sh4BATF3-transduzierten cHL-Linien einen stärkeren nachteiligen Effekt auf das Wachstum. Die ALCL-Linien Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1 zeigen nach shBATF3-Infektion einen noch stärkeren

Wachstumsnachteil als die cHL-Linien. Hier sind 21 Tage nach der Transduktion mit sh1BATF3 nur noch 20-55% und mit sh4BATF3 nur noch 20% der Zellen GFP⁺. Im Gegensatz zu den sechs getesteten cHL- und ALCL-Linien, die alle einen deutlichen Wachstumsnachteil der shBATF3-transduzierten Zellen zeigen, reagieren die PMBL-Linien unterschiedlich auf die Herunterregulation von BATF3. Der Anteil GFP⁺ MedB-1 Zellen ändert sich nach Transduktion mit sh1BATF3 nicht und nach Transduktion mit sh4BATF3 nur geringfügig auf 75%. Dagegen ist ein starker Wachstumsnachteil bei BATF3-Herunterregulation in K1106P Zellen zu beobachten. Hier sind 21 Tage nach Transduktion mit sh1BATF3 nur noch 20% und mit sh4BATF3 nur noch 35% der Zellen GFP-positiv. Als Kontrolle wurden die BL-Linie DAUDI, die GCB-DLBCL-Linie SU-DHL-4 und die T-ALL-Linie Jurkat verwendet. Diese Zelllinien exprimieren kein bis nur sehr schwach BATF3 (Abbildung 2). DAUDI, SU-DHL-4 und Jurkat zeigen keinen Wachstumsnachteil nach Infektion mit shRNAs gegen BATF3 über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen. Es lässt sich aus der kompetitiven Wachstumsanalyse der Lymphom-Linien feststellen, dass nach Herunterregulation von BATF3 die getesteten cHL- und ALCL-Linien sowie die PMBL-Linie K1106P einen starken Wachstumsnachteil in der Mischkultur zeigen. Diese Effekte sind mit beiden shRNAs gegen BATF3 zu beobachten, allerdings haben die mit sh4BATF3-transduzierten Zellen einen größeren Wachstumsnachteil. Jedoch ist die Herunterregulation von BATF3 gezielt toxisch für Zelllinien dieser Lymphomtypen, da BL-, GCB-DLCBL- und T-ALL-Linien keine nachteiligen Effekte zeigen.

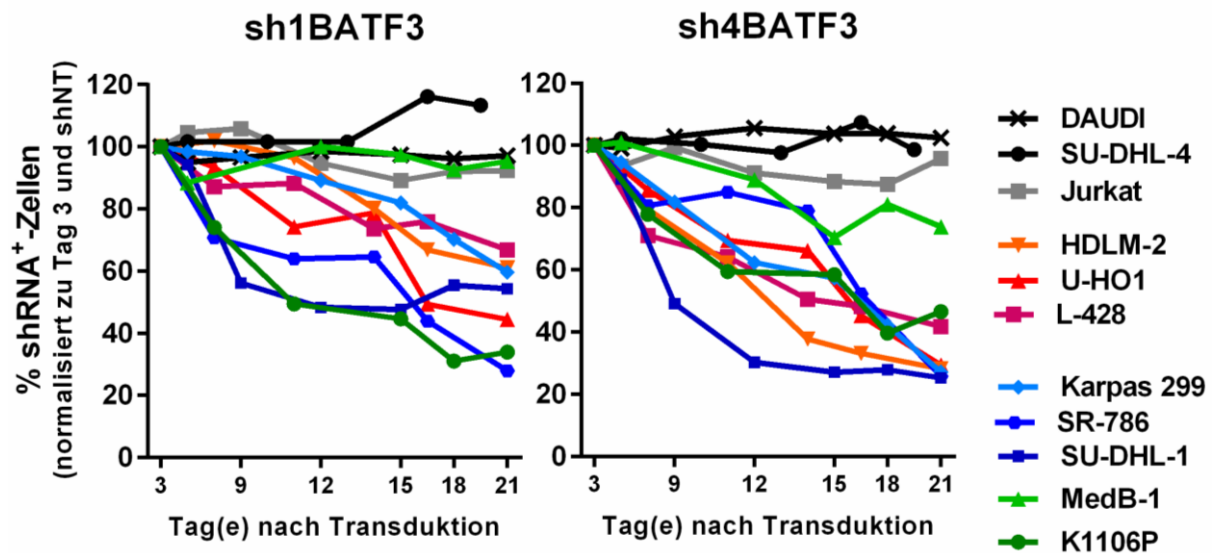


Abbildung 12: Kompetitives Wachstumsverhalten nach BATF3-Herunterregulation in Lymphom-Zelllinien. cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien wurden mit den angegebenen shRNAs gegen BATF3 infiziert und ihr Wachstumsverhalten in der Mischkultur, gemessen anhand der GFP-Expression, wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen verfolgt. Als Kontrolle wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet, die keine oder nur sehr geringe BATF3-Expression im Vergleich zu den cHL-Linien besitzen (BL-Linie DAUDI, GCB-DLBCL-Linie SU-DHL-4, T-ALL-Linie Jurkat). Die Messung wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Messpunkte wurden zur Messung von Tag 3 und zur shNT-transduzierten Kontrolle normalisiert. cHL-, ALCL- und die PMBL-Zelllinie, Karpas 1106P (K1106P), zeigen einen Wachstumsnachteil nach BATF3-Herunterregulation. Für cHL-, ALCL- und PMBL-Linien wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.7.1 Proliferationsanalyse in shBATF3-transduzierten cHL- und ALCL-Zelllinien

Die beobachteten nachteiligen Wachstumseffekte in den shBATF3-transduzierten Zelllinien, können unter anderem auf eine reduzierte Zellproliferation zurückzuführen sein. Um die Auswirkungen der Herunterregulation von BATF3 auf das Proliferationsverhalten in cHL- und ALCL-Zelllinien zu analysieren, wurden die Zellen nach Transduktion mit dem Zellmembranfarbstoff Vybrant DiD markiert. Bei jeder Zellteilung teilt sich der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen auf und die Proliferation der Zellen ist somit anhand der Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) über den Beobachtungszeitraum im Durchflusszytometer feststellbar. Die cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 sowie die ALCL-Linien Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1 wurden für die Proliferationsanalyse verwendet. Vier Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit dem Farbstoff markiert und die MFI der GFP⁺ (transduzierten) Zellen für diesen Messzeitpunkt (Tag 0) bestimmt. Die mit sh1BATF3- und sh4BATF3-transduzierten Lymphom-Linien wurden zum Anfangsmesswert und zur shNT-transduzierten Kontrolle normalisiert. Bei der

Analyse der cHL-Linie HDLM-2 zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der MFI in der shNT-transduzierten Probe, was für eine konstante Proliferation über den Messzeitraum spricht. Hingegen ist bei den beiden shBATF3-transduzierten HDLM-2-Proben eine geringere Proliferationsrate feststellbar, da die MFI in diesen Proben über die beiden Messzeitpunkte weniger abnimmt (Abbildung 13). Für die cHL-Linie L-428 ist ebenfalls festzustellen, dass shBATF3-transduzierte L-428 eine geringere Abnahme der MFI verzeichnen und somit langsamer proliferieren als L-428-Zellen, die BATF3 nicht herunterregulieren. In der U-HO1-Zelllinie zeigen sh1BATF3- und sh4BATF3-transduzierte Zellen ebenfalls eine langsamere Proliferation als shNT-transduzierte Zellen, was anhand der höheren MFI im Vergleich zur Kontroll-Zell-Population über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen sichtbar wird. Die ALCL-Zelllinien SR-786 und SU-DHL-1 proliferieren nach BATF3-Herunterregulation ebenfalls langsamer im Vergleich zur Kontrolle, was durch die langsamere Abnahme der MFI deutlich wird. Ausnahme bildet die ALCL-Linie Karpas 299, da kaum ein Unterschied in der MFI zwischen shBATF3- und shNT-transduzierten Zellen erkennbar ist. Die Herunterregulation von BATF3 hat also keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Karpas 299-Zellen. Alle drei getesteten cHL-Zelllinien (HDLM-2, L-428 und U-HO1) und zwei von drei getesteten ALCL-Zelllinien (SR-786 und SU-DHL-1) zeigen eine verringerte Proliferation nach BATF3-Herunterregulation. Somit führt die Herunterregulation von BATF3 zu toxischen Effekten in Form einer verminderten Proliferationsfähigkeit in cHL- und ALCL-Zelllinien, was die Abhängigkeit der cHL- und ALCL-Linien von BATF3 unterstreicht.

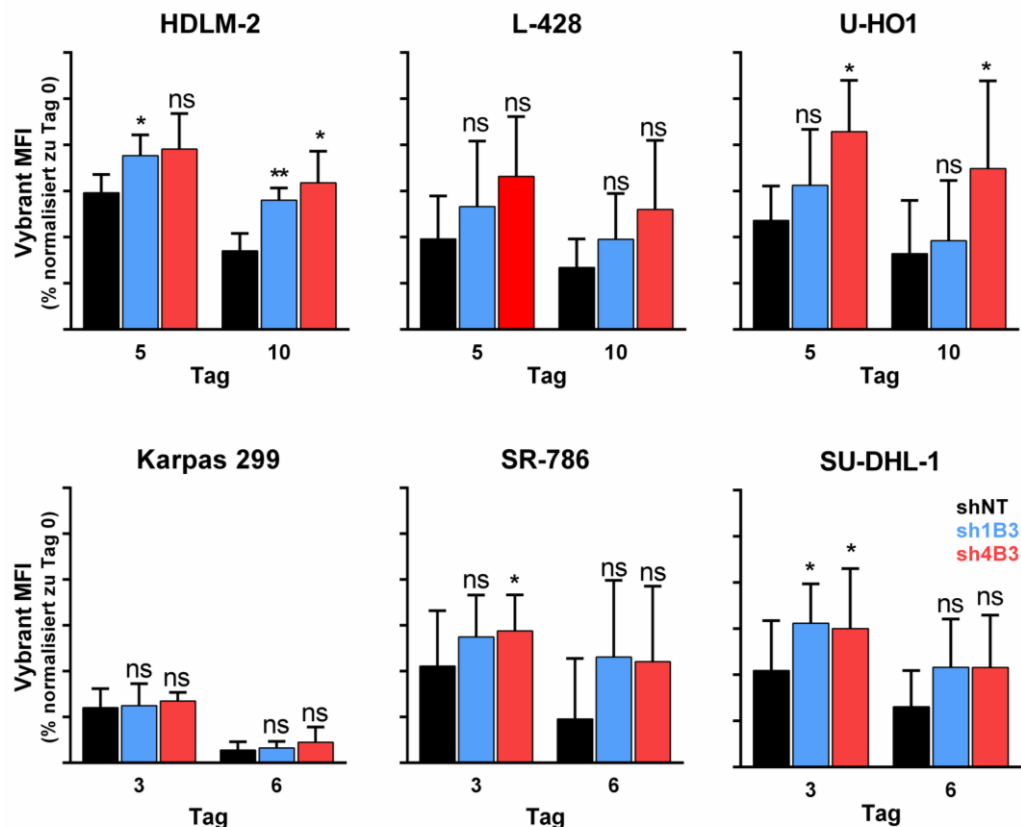


Abbildung 13: Reduzierte Proliferation von cHL- und ALCL-Zelllinien nach shBATF3-Transduktion. Die cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 wurden 4 Tage nach Transduktion mit shRNAs gegen BATF3 (sh1B3 und sh4B3) oder einer shRNA ohne Zielsequenz (shNT) mit dem Zellmembranfarbstoff Vybrant DiD markiert und es wurde der Zeitpunkt 0 gemessen. Fünf und 10 Tage später wurde ein weiteres Mal die MFI gemessen und zum Startmesspunkt verglichen. Bei den ALCL-Zelllinien wurde die Messung 3 und 6 Tage nach Beginn des Experiments durchgeführt, weil diese eine schnellere Proliferationsrate als die cHL-Linien aufweisen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate pro Zelllinie durchgeführt (verändert nach Lollies et al. 2017). B3 – BATF3; * $p < 0,05$; ns – nicht signifikant.

3.7.2 Analyse des Zelltods nach BATF3-Herunterregulation im cHL und ALCL

Neben reduzierter Proliferation kann der beobachtete Wachstumsnachteil von BATF3-herunterregulierenden cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien unter kompetitiven Wachstumsbedingungen auch durch erhöhte Apoptose bedingt sein. Deshalb wurde der Effekt der BATF3-Herunterregulation auf das Überleben von cHL- und ALCL-Zelllinien mit Hilfe einer Annexin V- und PI-Färbung untersucht. Da sterbende Zellen die Expression von GFP verlieren, wurden die zu untersuchenden cHL- und ALCL-Zelllinien 4 Tage nach der lentiviralen Infektion für GFP-Positivität sortiert. So wurde sichergestellt, dass nur transduzierte Zellen in die Analyse einbezogen wurden. Anschließend wurden die sortierten Zellen wieder für 3 Tage in Kultur genommen,

damit sie sich vom Stress des Sortierens erholen konnten, und mit Annexin V und PI gefärbt. Für die weitere Analyse wurden Zelltrümmer mit Hilfe des FSC-A und SSC-A Auswahlfensters ausgeschlossen. Nach der Färbung mit Annexin V und PI sind mehrere Populationen in der „dot plot“-Darstellung erkennbar: Annexin V⁻ und PI⁻-Zellen, welche die lebende Zell-Population darstellt, Annexin V⁺ PI⁻-Zellen, die sich in der Phase des frühen Zelltods befinden und Annexin V⁺ PI⁺-Zellen stellen die Population dar, welche sich in der späteren Phase des Zelltods befindet. Zur Bestimmung des Anteils der sterbenden Zellfraktion wurden alle Annexin V⁺-Zellen ausgewählt.

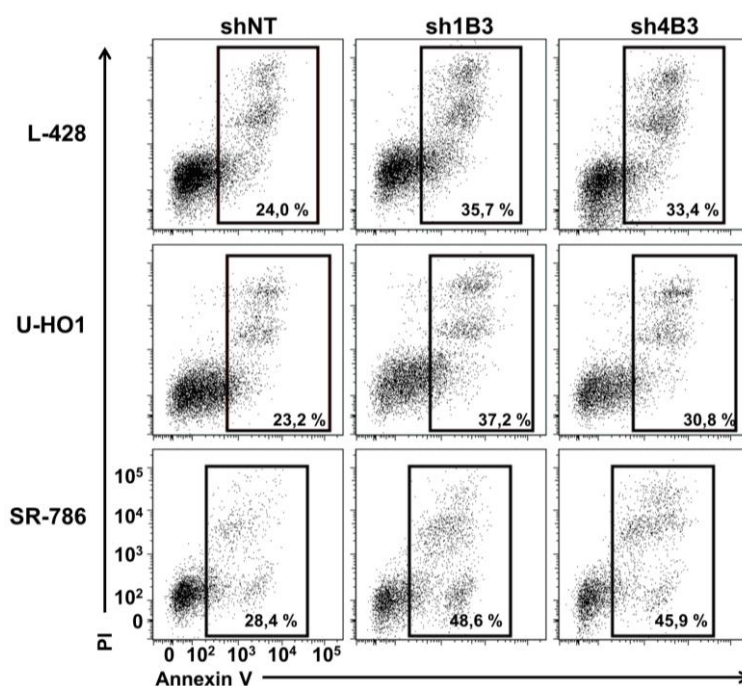


Abbildung 14: Verringeretes Überleben von L-428, U-HO1 und SR-786 nach BATF3-Herunterregulation. Dargestellt sind repräsentative Annexin V- und PI-Färbungen von mit shRNAs transduzierten Zellen, welche nach Sortierung (GFP⁺) für 3 Tage wieder kultiviert wurden. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo-Software. Der prozentuale Anteil Annexin V-positiver Zellen ist hervorgehoben (verändert nach Lollies et al. 2017).

In Abbildung 14 ist repräsentativ eine Annexin V- und PI-Analyse für die cHL-Linien L-428 und U-HO1 und die ALCL-Linie SR-786 gezeigt. In der Kontrolle der L-428-Zellen sind 24% positiv für Annexin V, in den shBATF3-transduzierten L-428-Zellen hingegen 35,7% (sh1BATF3) bzw. 33,4% (sh4BATF3). Ebenfalls in U-HO1-Zellen steigt der Anteil Annexin V-positiver Zellen von 23,2% nach Transduktion mit shNT auf 37,2% bzw. 30,8 % nach Transduktion mit sh1BATF3 bzw. sh4BATF3. Im Falle der ALCL-Linie SR-786 ist die Zunahme sterbender Zellen nach Herunterregulation von BATF3 noch deutlicher ausgeprägt. Hier sind in der shNT-Kontrolle 28,4% der

Zellen Annexin V-positiv und 48,6% bzw. 45,9% in sh1BATF3- bzw. sh4BATF3-transduzierten SR-786 ALCL-Zellen (Abbildung 15).

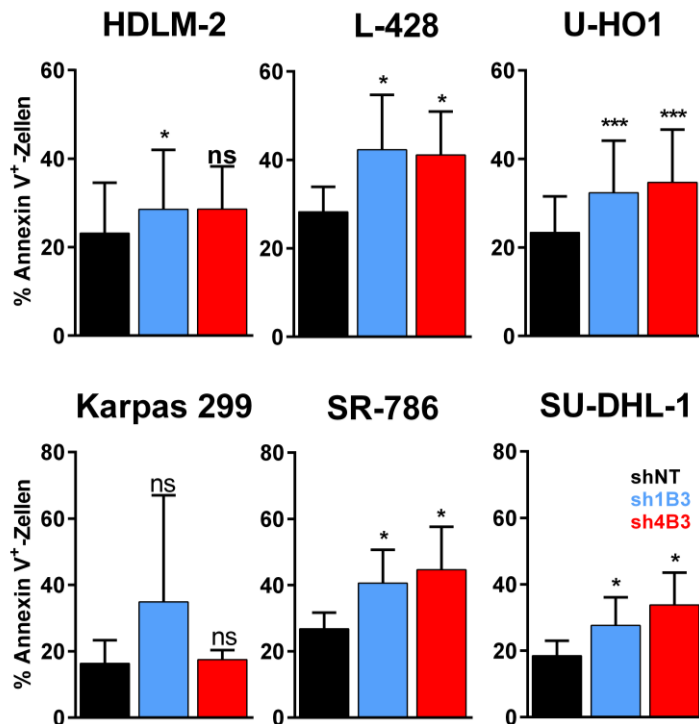


Abbildung 15: Die Herunterregulation von BATF3 führt zu einer Zunahme von apoptotischen cHL- und ALCL-Zellen. GFP⁺ sortierte cHL- und ALCL-Zelllinien wurden 7 Tage nach der Infektion mit Annexin V und PI gefärbt. Pro Zelllinie wurden mindestens drei biologische Replikate angefertigt. Dargestellt ist der Anteil Annexin V-positiver Zellen in shNT- und shBATF3-transduzierten Zellen (verändert nach Lollies et al. 2017). B3 – BATF3. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns – nicht signifikant.

In der graphischen Zusammenfassung der biologischen Replikate der Annexin V-/PI-Färbung sind ebenfalls die Ergebnisse der cHL-Linie HDLM-2 sowie der ALCL-Linien Karpas 299 und SU-DHL-1 dargestellt (Abbildung 15). Mit einer Ausnahme nimmt in allen getesteten Zelllinien der Anteil Annexin V-positiver Zellen mit Herunterregulation von BATF3 statistisch signifikant zu (im Mittel um 10-20%). Karpas 299-Zellen zeigen nach Transduktion mit den shRNAs gegen BATF3 keine Veränderung im Anteil sterbender Zellen im Vergleich zur shNT-Kontrolle [ein Ausreißer], d.h. BATF3 scheint keinen Einfluss auf die Apoptose dieser Zellen zu haben.

Beim programmierten Zelltod, der Apoptose, spielen Caspasen, spezifische Cysteinproteasen eine essentielle Rolle. Caspase 3 gehört zu den Effektor-Caspasen und wird von Initiator-Caspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert, damit sie anschließend andere Zielproteine der Apoptose spalten kann (Porter et al. 1999). Um zu klären, ob die Herunterregulation von BATF3 apoptotische Signalwege aktiviert, wurden die Zellen auf aktive Caspase 3 untersucht. Die Aminosäuresequenz DEVD wird von aktiver Caspase 3 erkannt und gespalten, und durch Verwendung eines Fluoreszenz-markierten DEVD-Derivat kann die Aktivität von Caspase 3 im Durchflusszytometer bestimmt werden. L-428, U-HO1 und SR-786 wurden für diese

Analyse verwendet. Nach Infektion mit den entsprechenden LeGO-Vektoren wurden GFP-exprimierende Zellen für aktive Caspase 3 gefärbt. Im Vergleich zu den shNT-transduzierten Zellen ist vermehrte Caspase 3-Aktivität in den shBATF3-transduzierten Zellen zu erkennen (Abbildung 16). In L-428 zeigen etwa 30–50% der Zellen nach BATF3-Herunterregulation Caspase 3-Aktivität, während etwa nur 15% der shNT-transduzierte Zellen Caspase 3-Aktivität aufweisen. In U-HO1 ist vor allem in der sh4BATF3-transduzierten Probe ein starker Anstieg der Caspase 3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. In der sh1BATF3-transduzierten U-HO1 ist ein leichter Anstieg von aktiver Caspase 3 zu sehen. In der Kontrolle der SR-786 sind etwa 8% positiv für aktive Caspase 3, hingegen zeigen rund 25% Caspase 3-Aktivität nach BATF3-Herunterregulation.

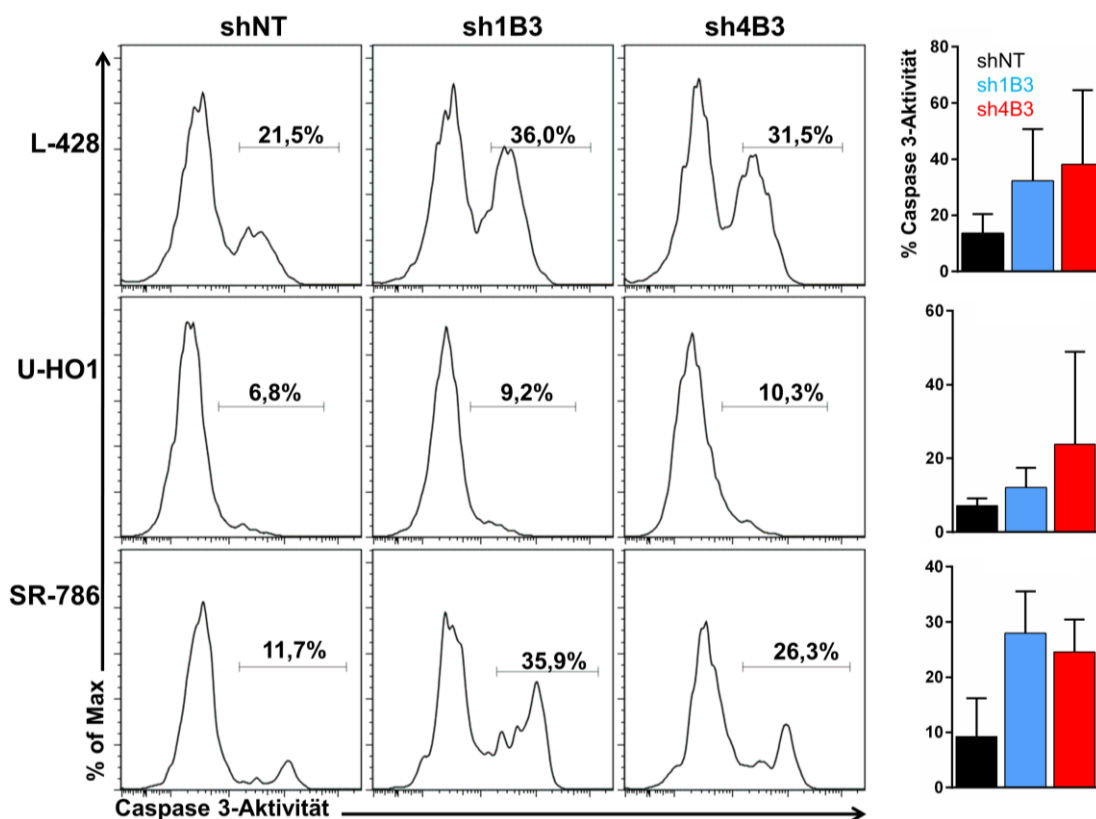


Abbildung 16: Erhöhte Caspase 3-Aktivität nach Transduktion von shRNAs gegen BATF3 in cHL- und ALCL-Linien. Die cHL-Linien L-428 und U-HO1 sowie die ALCL-Linie SR-786 wurden 7 Tage nach lentiviraler Transduktion mit shRNAs für aktive Caspase 3 gefärbt. Alle analysierten Zelllinien zeigen nach BATF3-Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Caspase 3-Aktivität, allerdings erreicht dies keine statistische Signifikanz. Die Zusammenfassung von drei biologischen Replikaten ist in den rechten Balkendiagrammen dargestellt (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.8 GEP von L-428 nach BATF3-Herunterregulation

BATF3 ist ein essentieller Faktor für cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien, da die Herunterregulation von BATF3 die Proliferation und das Überleben der Zellen beeinträchtigt. Mit Hilfe von GEP shBATF3-transduzierter Zellen sollten mögliche Zielgene identifiziert werden, die unter anderem eine kritische Rolle in diesen Prozessen spielen. Hierzu wurde die cHL-Linie L-428 mit shNT- und sh4BATF3-enthaltenen Viruspartikeln infiziert und GFP⁺-Zellen wurden 3 Tage nach der Infektion für Protein- und RNA-Extraktionen sortiert. Es wurden drei biologische Replikate von shNT- und sh4BATF3-transduzierten L-428 Zellen angefertigt. Die extrahierten RNAs wurden für die GEP an das Biochip-Labor von PD Dr. Klein-Hitpass übergeben. In Abbildung 17 sind die differenziell exprimierten Gene ($p < 0,05$; $FC \geq 1,3$) zwischen shNT- und sh4BATF3-transduzierten L-428-Zellen dargestellt. Es wurden 107 Gene detektiert, die mindestens 1,3-fach hoch- oder herunterreguliert sind, von denen in den sh4BATF3-transduzierten Zellen 46 herunter- und 61 hochreguliert sind. Eine Tabelle mit allen Genen und den dazugehörigen FC ist im Anhang zu finden. Unter Berücksichtigung von nur Protein-kodierenden Genen verbleiben 22 Gene, die nach BATF3-Transduktion herunterreguliert sind und 52, die hochreguliert sind. BATF3 ist mit einem FC von -1,86 das stärkste herunterregulierte Protein-kodierende Gen in sh4BATF3-transduzierten L-428 Zellen. Eine sogenannte „*heat-map*“ veranschaulicht die unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den beiden Proben (Abbildung 17). Die erfolgreiche Herunterregulation von BATF3 auf Proteinebene in den drei biologischen Replikaten der sh4BATF3-transduzierten L-428 im Vergleich zur shNT-transduzierten L-428 ist in Abbildung 17 dargestellt. Eine kompetitive Wachstumsanalyse in der Mischkultur über einen Zeitraum von 24 Tagen veranschaulicht ebenfalls den Wachstumsnachteil der sh4BATF3-transduzierten Zellen.

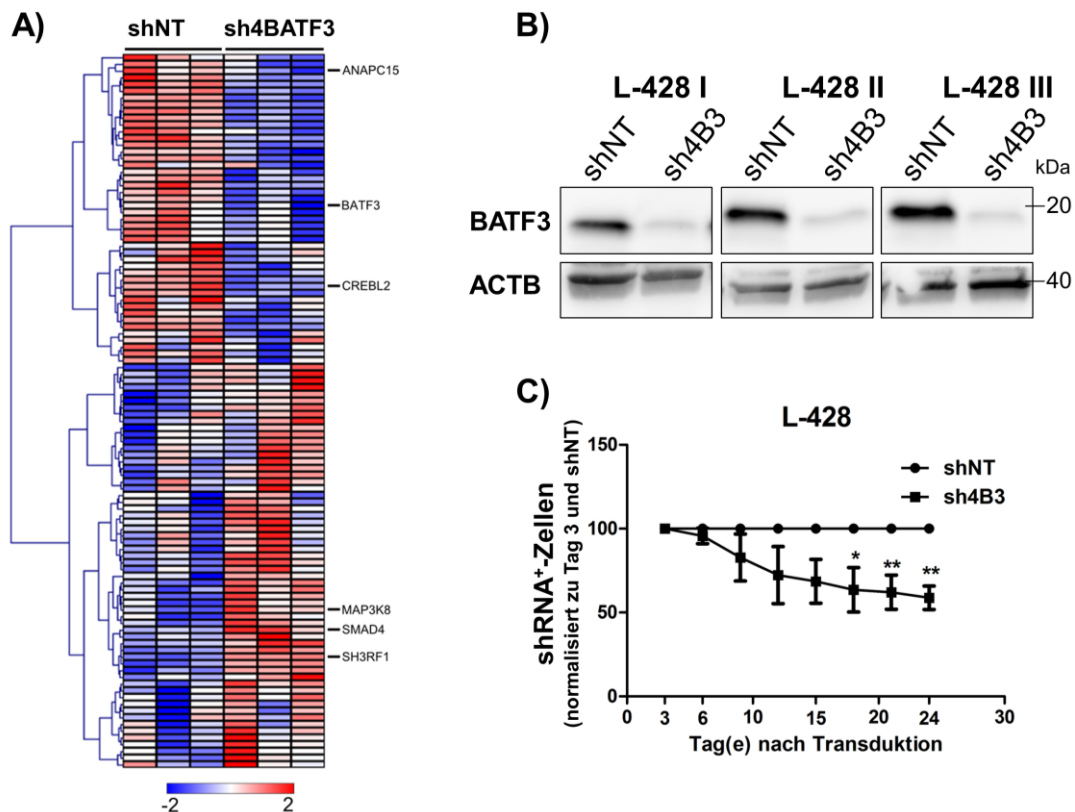


Abbildung 17: Genexpressionsprofil (GEP) von shBTF3-transduzierten L-428-Zellen. A) „Heat map“ der signifikant differenziell ausgeprägten Gene in shNT- und sh4BTF3-transduzierten L-428-Zellen, die mindestens 1,3-fach hoch- oder herunterreguliert sind. B) Western-Blot-Analyse der BTF3-Herunterregulation in den drei biologischen Replikaten, die für die GEP verwendet wurden. GFP-positive Zellen wurden 3 Tage nach der Transduktion sortiert. ACTB wurde als Ladekontrolle verwendet. C) Kompetitive Wachstumsanalyse der drei biologischen Replikate der transduzierten L-428. Die sh4BTF3-transduzierten cHL-Zellen zeigen einen deutlichen Wachstumsnachteil. GFP-positive Zellen wurden zu Tag 3 und der shNT-Kontrolle normalisiert (verändert nach Lollies et al. 2017). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Zur weiteren Validierung der BTF3-regulierten Gene wurden fünf Gene ausgewählt, die durch qRT-PCR-Analyse in L-428 sowie zusätzlich HDLM-2 und U-HO1 cHL-Zelllinien bestätigt werden sollten. SMAD4, das 1,7-fach hochreguliert ist, kann zusammen mit SMAD3, JUN und FOS einen multimeren Komplex bilden, der AP-1-Expression reguliert (Zhang et al. 1998). SH3RF1 ist 1,5-fach hochreguliert, ist an der JNK (c-Jun N-terminale Kinase aka MAPK8)-Signaltransduktion beteiligt und kann Apoptose induzieren (Figueroa et al. 2003). Da JNK eine MAP-Kinase ist und AP-1-Faktoren phosphoryliert, wurde dieses Gen als interessantes Zielgen von BTF3 betrachtet. MAP3K8 ist ebenfalls eine Kinase aus dem MAPK/ERK-Signalweg, die nach BTF3-Herunterregulation höher exprimiert ist (Arthur et al. 2013). Schließlich wurde mit ANAPC15 ein Regulator der Zellproliferation, und der bZIP-Transkriptionsfaktor CREBL2 ausgewählt, die beide nach sh4BTF3-

Transduktion in der GEP herunterreguliert sind (Ma et al. 2011, Mansfeld et al. 2011). Neben L-428 wurden die beiden cHL-Linien HDLM-2 und U-HO1 zur Validierung der differentiellen Expression der ausgewählten Zielgene mit shNT und sh4BATF3 transduziert und nach 3 Tagen auf GFP-Positivität sortiert. Es wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und eine qRT-PCR mit TaqMan-Sonden durchgeführt. Als Kontrolle wurde BATF3-mRNA-Expression ebenfalls analysiert. Für alle drei cHL-Zelllinien wurden drei biologische Replikate angefertigt. In allen drei Zelllinien wurde BATF3 um etwa 70% herunterreguliert. SH3RF1 wurde in allen drei Zelllinien im Mittel 1,8- bis 2,5-fach höher exprimiert nach BATF3-Herunterregulation, in der HDLM-2 und U-HO1 ist die verstärkte SH3RF1-Expression statistisch signifikant. ANAPC15 zeigt in allen drei cHL-Linien eine Reduktion der mRNA-Level um 20-60% nach shBATF3-Transduktion. Es erreicht jedoch nur die HDLM-2 signifikant herunterregulierte Level von ANAPC15 mit einer Reduktion der mRNA um etwa 60%. MAP3K8 wird in allen drei Linien stärker ausgeprägt in sh4BATF3-transduzierten Zellen, allerdings ist dies nur in der HDLM-2 mit einer 1,4-fachen Hochregulation signifikant. CREBL2 wird mit einer Reduktion um 50-60% signifikant herunterreguliert in L-428 und U-HO1 nach shBATF3-Transduktion. Für SMAD4 kann zwar eine Tendenz der verstärkten Ausprägung um etwa 1,3-fach in allen drei cHL-Linien festgestellt werden, diese ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 18). Für die fünf ausgewählten Gene lässt sich also eine BATF3-abhängige Regulation feststellen. Wenn auch nicht alle Gene in allen drei cHL-Zelllinien signifikant reguliert sind, so ist eine identische Tendenz zwischen allen Zelllinien zu erkennen und stimmt mit den Ergebnissen der GEP überein. Unter den ausgewählten Zielgenen befinden sich SH3RF1 und MAP3K8, die beide in der Regulation von AP-1-Aktivität beteiligt sein

können. SH3RF1 kann außerdem Apoptose initiieren, somit könnte dies ein Faktor sein, der mit für die erhöhte Apoptoserate in BATF3-herunterregulierten cHL-Linien verantwortlich ist. ANAPC15 ist als Zellproliferations-Regulator charakterisiert und zeigt eine deutliche Abnahme nach shBATF3-Transduktion in cHL-Linien, was unter anderem die verminderte Proliferation von cHL- und ALCL-Linien verursachen könnte. Der bZIP-Transkriptionsfaktor CREBL2 zeigt ebenfalls eine starke Herunterregulation nach BATF3-Transduktion in cHL-Linien. Die GEP von shBATF3-transduzierten cHL-Zellen konnte somit wichtige Zielgene von BATF3 identifizieren, die eine essentielle Rolle bei der Ausprägung des toxischen Phänotyps von BATF3-herunterregulierenden cHL- und ALCL-Linien spielen könnten.

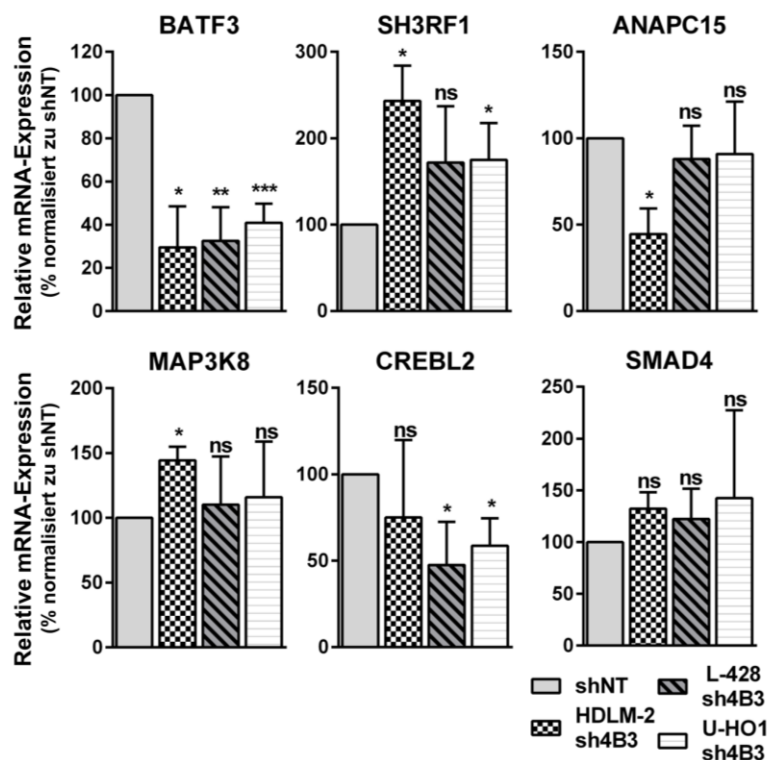


Abbildung 18: Validierung von BATF3-Zielgenen in cHL-Zelllinien. Es wurden fünf potentielle BATF3-Zielgene basierend auf den Ergebnissen der GEP ausgewählt und deren Expression mittels qRT-PCR in HDLM-2, L-428 und U-HO1 nach shRNA-Transduktion untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression nach Normalisierung zu ACTB und der shNT-transduzierten Kontrolle ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Drei bis vier biologische Replikate wurden angefertigt und GFP⁺-Zellen wurden 3 Tage nach Infektion sortiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind zu erkennen durch * $p < 0,05$, ns – nicht signifikant (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.8.1 Expression von BATF in cHL- und ALCL-Linien nach BATF3-Herunterregulation

Da BATF in einer BATF3-defizienten Maus die Funktionen von BATF3, die Entwicklung von CD8 α^+ -cDCs, übernehmen kann und andersherum BATF3 ebenfalls für BATF kompensieren kann (Tussiwand et al. 2012), wurde die BATF-Expression von shBATF3-transduzierten cHL- und ALCL-Linien analysiert. Um zu klären, ob

BATF auf Proteinebene in Lymphom-Linien ausgeprägt ist, wurden Western-Blots von HL- und NHL-Linien durchgeführt. cHL- und ALCL-Linien zeigen eine BATF-Ausprägung. HDLM-2, L-1236 und die drei ALCL-Zelllinien, Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1, besitzen eine moderate BATF-Expression, während KM-H2, L-428, SUP-HD1 und U-HO1 starke BATF-Ausprägung aufweisen (Abbildung 19). Die BL-Linien DAUDI und RAJI und die GCB-DLBCL-Linien SU-DHL-4 und SU-DHL-6 haben keine detektierbaren BATF-Proteinlevel. Als nächstes wurden die GEP der shNT- und sh4BATF3-transduzierten L-428-Linie auf BATF und BATF2 Ausprägung untersucht (Abbildung 19). BATF- und BATF2-mRNA sind in der shNT- und shBATF3-transduzierten L-428 gleich exprimiert. Beide zeigen schwächere Ausprägung als BATF3. So liegen die mRNA-Expressionswerte für BATF bei etwa 300 und die BATF2-Expression zeigt mit Werten um 50 kaum detektierbare mRNA-Level. Daher ist davon auszugehen, dass cHL-Linien BATF2 nicht ausprägen und somit wurde nur BATF auf Proteinebene nach BATF3-Herunterregulation analysiert. Anschließend wurden U-HO1 und SR-786 auf ihre BATF-Proteinausprägung nach BATF3-Herunterregulation analysiert. Drei Tage nach Infektion mit den entsprechenden LeGO-Viren wurden GFP⁺-Zellen sortiert und für einen Western-Blot aufbereitet. Parallel zu BATF wurde auch BATF3-Expression untersucht, um die erfolgreiche Herunterregulation von BATF3 bestätigen zu können. Der BATF3 Western-Blot zeigt eine sehr effiziente Herunterregulation in beiden Zelllinien. In U-HO1 ist in der sh1BATF3-transduzierten Probe kein BATF3 detektierbar und in der sh4BATF3-transduzierten Probe ist nur eine sehr schwache Bande erkennbar. BATF zeigt kaum differentielle Proteinlevel zwischen den Proben mit BATF3-Herunterregulation im Vergleich zur shNT-Kontrolle. Die sh1BATF3-transduzierte Probe besitzt 112% BATF-Expression nach Normalisierung auf ACTB und der shNT-transduzierte Kontrolle. Die sh4BATF3-transduzierten Probe hat 81% BATF nach Normalisierung im Vergleich zur shNT-Kontrolle. In SR-786 sind nach BATF3-Herunterregulation 85% bzw. 70% BATF nach Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierte Kontrolle zu finden (Abbildung 19). Abschließend ist festzustellen, dass die Herunterregulation von BATF3 keine Effekte auf die Expression von BATF und BATF2 hat. Es ist also davon auszugehen, dass die toxischen Effekte auf die spezifische Herunterregulation von BATF3 zurückzuführen sind.

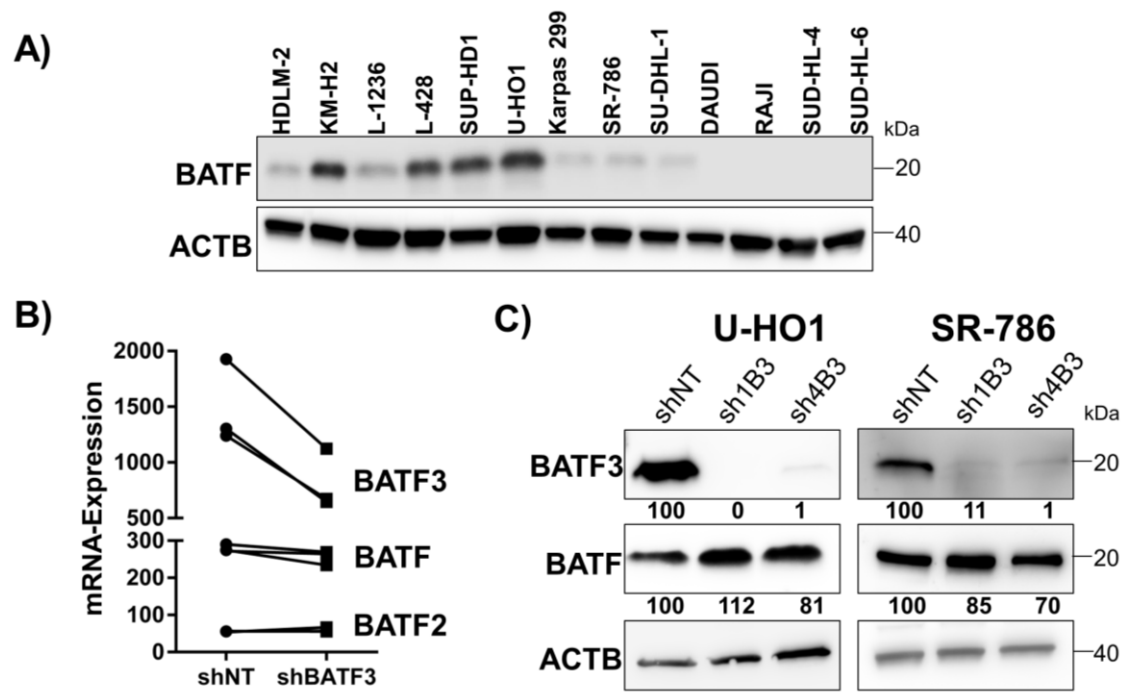


Abbildung 19: BATF-Ausprägung in Lymphom-Zelllinien. A) Der Western-Blot zeigt BATF-Expression in cHL- und NHL-Zelllinien. BATF-Protein ist in cHL- und ALCL-Linien detektierbar. ACTB wurde als Ladekontrolle verwendet. B) Die BATF, BATF2 und BATF3-mRNA-Ausprägung von shBATF3-transduzierten L-428 ist dargestellt. Die Expressionswerte stammen aus den GEP der drei biologischen Replikate der shNT- und sh4BATF3-transduzierten L-428. C) BATF-Ausprägung in shBATF3-transduzierten U-HO1 und SR-786. Die Western-Blot-Analyse veranschaulicht konstante BATF-Level nach BATF3-Herunterregulation. Es wurde zur shNT-Kontrolle und zur Ladekontrolle ACTB normalisiert. Die prozentuale Expression ist unter der Western-Blot-Grafik dargestellt. Es wurden zwei biologische Replikate angefertigt und GFP⁺-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion sortiert. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.8.2 Genset-Anreicherungsanalyse von shBATF3-transduzierten L-428-Zellen

Die Genset-Anreicherungsanalyse (engl. *gene set enrichment analysis*, GSEA) ist eine Computer-basierte Methode, die vergleicht, ob zwischen zwei biologischen Gruppen ein definiertes Set von Genen statistisch signifikante Unterschiede aufweist (Subramanian et al. 2005). Ein sogenannter Anreicherungs Wert (engl. *Enrichment-Score*, ES) gilt dabei als Anhaltspunkt zu welchem Grad die Gene aus einem Genset über- oder unterrepräsentiert sind. Um Signalwege zu identifizieren, die von BATF3 reguliert werden können, wurde eine GSEA mit der „Hallmark“-Kollektion und der *c2cp* „curated gene set/canonical pathways“-Kollektion durchgeführt. Diese sind Genset-Kollektionen, welche auf Grundlage von Online-Datenbanken, Publikationen und dem Wissen von Experten zusammengestellt wurden.

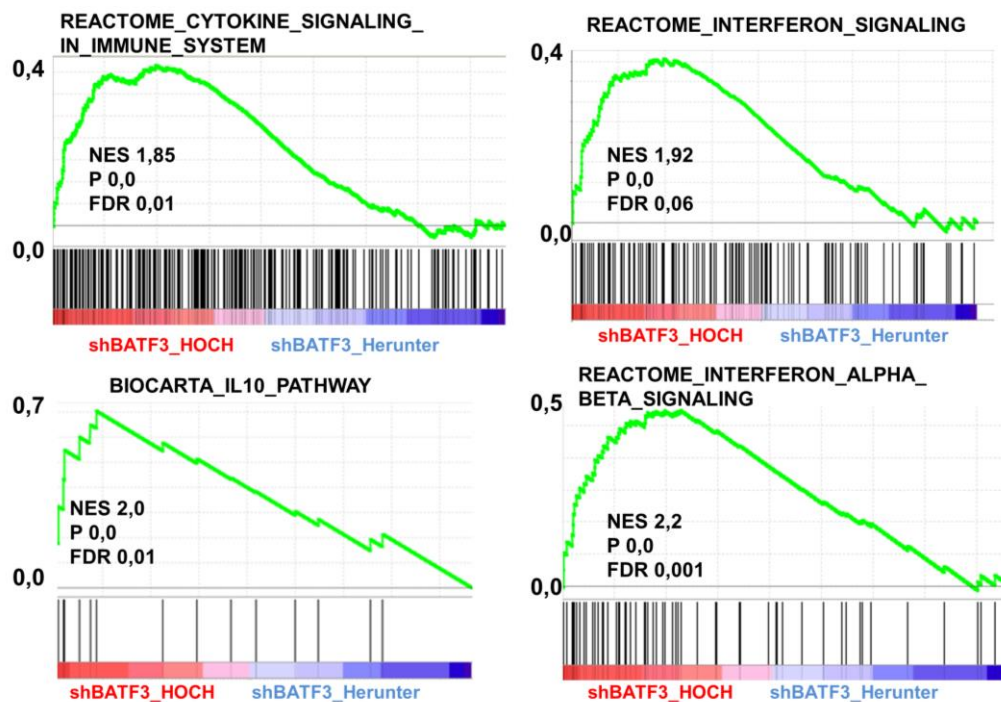


Abbildung 20: Anreicherung von verschiedenen Gensets in sh4BATF3-transduzierten L-428 Zellen, die mit dem JAK/STAT-Signalweg verknüpft sind. Gensets, die mit Interleukin-, Interferon- und Zytokin-Signalwegen assoziiert sind, sind signifikant angereichert in sh4BATF3-transduzierten Zellen. Hier wurde die *c2cp* „curated gene sets/ canonical pathways“-Kollektion ausgewählt. Als Filterkriterien wurde ein FDR < 1% und ein p-Wert < 0,01 gewählt.

Die GSEA von sh4BATF3-transduzierten L-428-Zellen zeigt im Vergleich zur shNT-transduzierten Kontrolle eine Anreicherung von Gensets, die mit dem JAK/STAT-Signalweg verknüpft sind (Abbildung 20). Drei Gensets basierend auf der Online-Signalweg Datenbank *REACTOME*, welche zur *c2cp*-Kollektion gehört, weisen Anreicherungen der Gensets „Cytokine-Signaling in immune system“, „Interferon signaling“ und „Interferon alpha beta signaling“ auf. Das Genset „Interleukin 10 Pathway“ einer weiteren Datenbank, *BIOCARTA*, ist ebenfalls angereichert in L-428-Zellen, die BATF3 herunterregulieren. Alle vier dargestellten Gensets zeigen einen NES (engl. *Normalized Enrichment-Score*) zwischen 1,85 und 2,2, was eine starke Anreicherung bedeutet (Abbildung 20). Die GSEA der „Hallmark“-Kollektion identifiziert ebenfalls eine Anreicherung von Genesets, welche mit dem JAK/STAT-Signalweg verknüpft sind, und bestätigt die Beobachtung aus der *c2cp* Genset-Kollektion. Die vier Gensets „Interferon Gamma Response“, „Interferon Alpha Response“, „IL6 JAK STAT3 Signaling“ und „TNFA Signaling via NFkB“ sind signifikant angereichert in L-428-Zellen, in denen BATF3 herunterreguliert ist (Tabelle 18). Sie haben einen NES von 1,94 bis 2,17, was einer starken Anreicherung entspricht. Als herunterregulierte Gensets sind „MYC targets V2“ und „MYC targets

V1“ zu finden, welche einen negativen NES von -1,75 und -1,94 aufweisen. Diese Gensets deuten darauf hin, dass Zielgene von MYC nach BATF3-Herunterregulation ebenfalls herunterreguliert sind. Die GSEA von sh4BATF3-transduzierten L-428-Zellen weist auf eine BATF3-abhängige Induktion von Interferon- und Zytokin- bzw. JAK/STAT-Signalwegen hin (Tabelle 18 und Abbildung 20).

Tabelle 18: Die GSEA zeigt unterschiedlich angereicherte Gensets nach BATF3-Herunterregulation. GEP von sh4BATF3-transduzierten Zellen wurden mit shNT-transduzierten L-428-Zellen verglichen. Dargestellt sind Gensets der „Hallmark“-Kollektion mit einem FDR < 1 % und einem p-Wert < 0,01. NES* – engl. *normalized enrichment score*.

Genset	NES*
angereichert in sh4BATF3	
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	2,17
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	2,12
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1,97
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	1,94
herunterreguliert in sh4BATF3	
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	-1,94
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	-1,75

3.9 MYC ist herunterreguliert nach Transduktion mit shBATF3

Die Analyse der GEP von L-428-Zellen nach BATF3-Herunterregulation gibt Hinweise auf eine Reduktion MYC-regulierter Gene. Die Analyse der MYC-mRNA-Expression in den GEP der transduzierten L-428 zeigt eine Reduktion der MYC-Level in sh4BATF3-transduzierten Zellen im Vergleich zur shNT-Kontrolle (Abbildung 21). Diese Reduktion ist jedoch nicht signifikant ($p=0,15$), was erklärt warum MYC nicht in der Liste der signifikant regulierten Zielgene von BATF3 zu finden ist (Anhang). In der shNT-transduzierten Kontrollprobe ist eine mittlere MYC-mRNA-Expression von 1190 zu finden. Die mittlere Expression in den sh4BATF3-transduzierten Zellen liegt hingegen bei 1040. MYC-Protein ist in der Western-Blot-Analyse von HL-Linien moderat bis stark exprimiert (Abbildung 21, ebenfalls beobachtet von Dr. Markus Schneider).

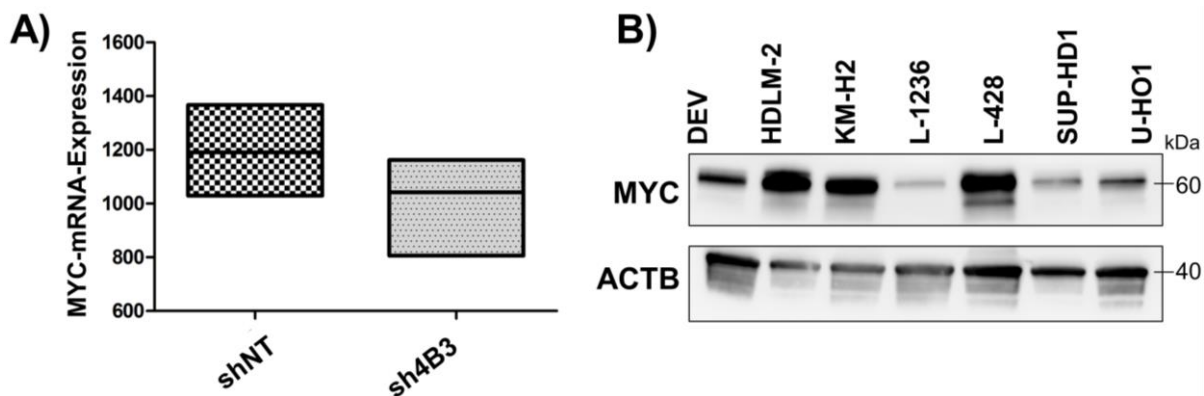


Abbildung 21: MYC-Herunterregulation in shBATF3-transduzierten L-428 und MYC-Proteinausprägung in HL-Linien. A) MYC-mRNA-Expression in shNT- und sh4B3-transduzierten L-428. Die Balken in der Abbildung markieren Minimum und Maximum der Messwerte. Der Mittelwert ist im Balken-Diagramm als mittlere schwarze Linie dargestellt. B) MYC-Proteinlevel in HL-Zelllinien. ACTB wurde als Ladekontrolle verwendet. Alle HL-Linien zeigen moderate bis starke MYC-Level. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

Um festzustellen, ob MYC-Protein nach BATF3-Herunterregulation verringert ist, wurde die MYC-Ausprägung nach lentiviraler Transduktion von shRNAs gegen BATF3 untersucht. Verschiedene Lymphom-Zelllinien wurden 4 Tage nach Infektion mit den entsprechenden LeGO-Viren sortiert und Western-Blots für BATF3 und MYC angefertigt. Es wurden mindestens $0,8 \times 10^5$ GFP-sortierte Zellen für eine Proteinexpressionsanalyse verwendet. In HDLM-2 ist nach BATF3-Herunterregulation ebenfalls eine Reduktion der MYC-Proteinlevel zu beobachten (Abbildung 22). ShBATF3-transduzierte HDLM-2-Zellen reduzieren BATF3-Level auf 12% (sh1BATF3) und auf 24% (sh4BATF3) und MYC-Level auf 41% (sh1BATF3) und 68% (sh4BATF3) im Vergleich zur shNT-transduzierten Kontrolle und ACTB. L-428-Zellen regulieren ebenfalls MYC nach Transduktion mit shRNAs gegen BATF3 herunter. Sh1BATF3-transduzierte L-428 reduzieren BATF3-Protein auf 10% und MYC auf 48%. Auch sh4BATF3-transduzierte L-428 regulieren BATF3 auf 10% und MYC auf 18% im Vergleich zu shNT-transduzierten L-428-Zellen und ACTB herunter. U-HO1-Zellen weisen nach BATF3-Herunterregulation ebenfalls verringerte MYC-Level auf. MYC-Protein sinkt in der U-HO1 nach BATF3-Herunterregulation auf 31% (sh1BATF3) und auf 54% (sh4BATF3) ab. BATF3 ist in shBATF3-transduzierten U-HO1 nicht mehr detektierbar (sh1BATF3) und auf 2% (sh4BATF3) nach Normalisierung auf shNT-transduzierte Kontrollzellen und ACTB gesunken. Die ALCL-Zelllinie Karpas 299 reguliert ebenso MYC herunter. So zeigen Karpas 299 eine Reduktion von MYC auf 40% (sh1BATF3) und auf 80% (sh4BATF3). ShBATF3-transduzierte Karpas 299-Zellen reduzieren BATF3-Proteinlevel auf 20% (sh1BATF3)

und auf 30% (sh4BATF3). SR-786-Zellen weisen nach BATF3-Herunterregulation auch eine Reduktion von MYC-Protein auf 43% (sh1BATF3) und 38% (sh4BATF3) auf. Die BATF3-Level sind auf 30% (sh1BATF3) und 12% (sh4BATF3) nach lentiviraler Infektion mit den entsprechenden Viren verringert. Die ALCL-Linie SU-DHL-1 reduziert die Proteinlevel von BATF3 auf 16% (sh1BATF3) und 5% (sh4BATF3) und von MYC auf 50% (sh1BATF3) und 35% (sh4BATF3) nach shBATF3-Transduktion (Abbildung 22). Es ist festzustellen, dass in allen untersuchten cHL- und ALCL-Zelllinien MYC-Protein nach BATF3-Herunterregulation reduziert ist. Eine Zusammenfassung der biologischen Replikate ist in Abbildung 22 zu sehen.

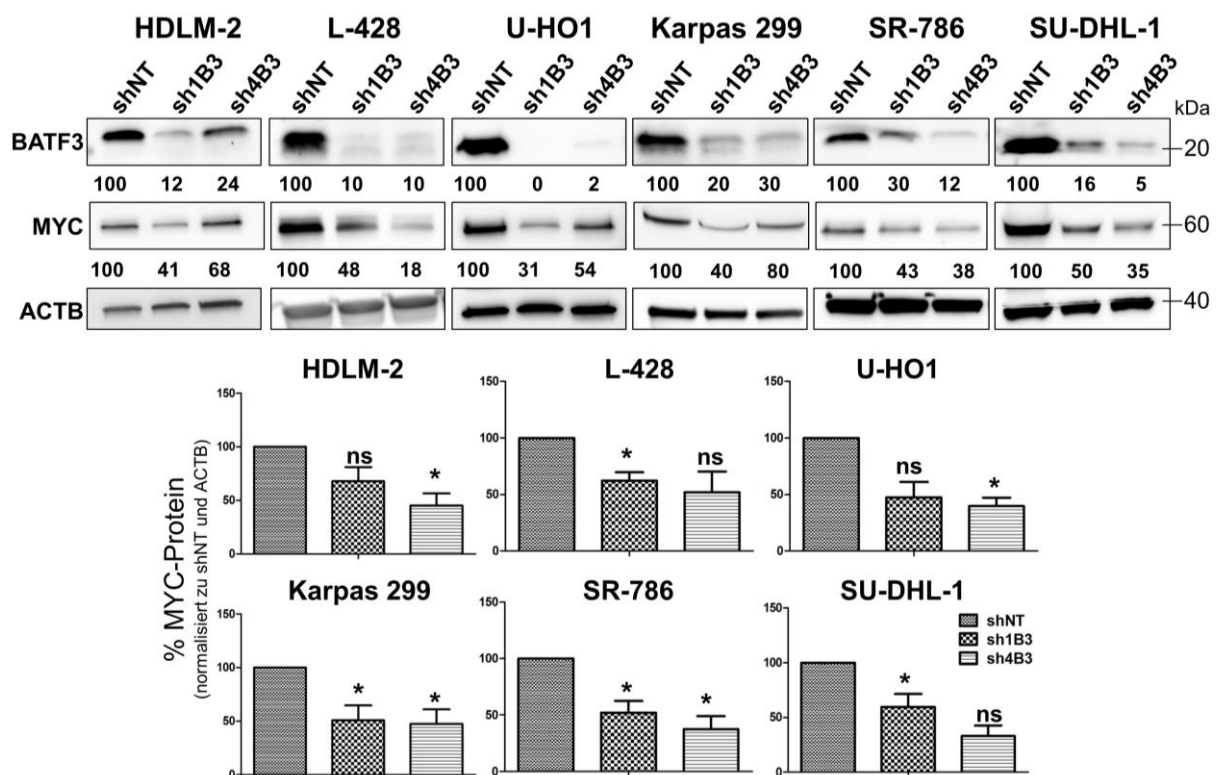


Abbildung 22: Abnahme der MYC-Proteinlevel nach BATF3-Herunterregulation in cHL- und ALCL-Zelllinien. In allen untersuchten cHL- und ALCL-Linien ist eine konsistente Abnahme von MYC nach BATF3-Herunterregulation festzustellen. Die prozentuale Expression nach Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierten Zellen ist unter der Western-Blot-Grafik dargestellt. Pro Zelllinie wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt und GFP⁺ Zellen wurden 3-4 Tage nach Infektion sortiert. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017). *p<0,05; ns – nicht signifikant.

Ebenfalls wurde die MYC-Ausprägung in PMBL-Linien nach Transduktion mit shRNAs gegen BATF3 untersucht (Abbildung 23). Hierzu wurden 4 Tage nach der lentiviralen Infektion GFP⁺-Zellen sortiert und Proteinlysate für die anschließende Western-Blot-Analyse hergestellt. Da die PMBL-Linie Karpas 1106P im Vergleich zu

cHL- und ALCL-Linien geringere BATF3-Level aufweist und zusätzlich schlechte Transduktionseffizienzen zeigt, konnten keine ausreichenden Zellmengen für eine Western-Blot-Analyse sortiert werden. Stattdessen wurde die BATF3- und MYC-Ausprägung mit Hilfe von qRT-PCR analysiert. Das erste Replikate der MedB-1 zeigt eine Herunterregulation der BATF3-Level auf 55% bzw. 64% im Vergleich zur Kontrolle. Die MYC-Level hingegen steigen auf 160% im Vergleich zur shNT-transduzierten Kontrolle und ACTB. Im zweiten Replikate von MedB-1 ist eine noch effizientere Herunterregulation von BATF3 zu sehen. ShBATF3-transduzierte MedB-1 regulieren BATF3-Proteinlevel auf 40% (sh1BATF3) und auf 29% (sh4BATF3) herunter. MYC-Protein steigt in sh1BATF3-transduzierten Zellen auf 156% an, in sh4BATF3-transduzierten Zellen sinken Proteinlevel jedoch auf 83%. Die BATF3-Level in der Karpas 1106P zeigen eine deutliche Abnahme nach Transduktion mit sh1BATF3 und sh4BATF3. ShBATF3-transduzierte Karpas 1106P regulieren BATF3 auf rund 40% (sh1BATF3) und auf 55% (sh4BATF3) herunter. Für MYC ist ebenfalls eine Abnahme zu verzeichnen nach Herunterregulation von BATF3. Hier liegen die MYC-mRNA-Level zwischen 55% und 70% nach shBATF3-Transduktion. Die Herunterregulation von BATF3 ist also in beiden PMBL-Linien zu sehen, allerdings zeigt nur die Karpas 1106P eine Herunterregulation von MYC wie es in cHL-Zelllinien zu beobachten war.

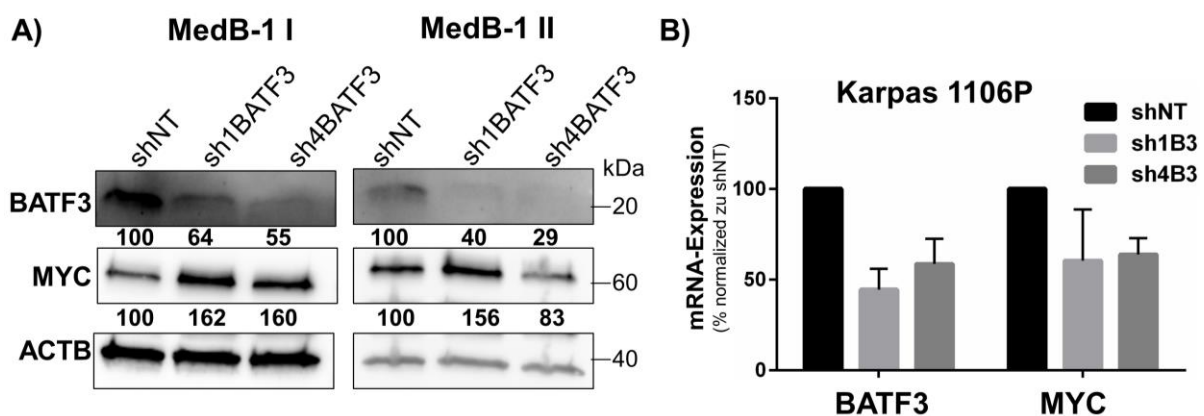


Abbildung 23: Herunterregulation von BATF3- und MYC-Ausprägung in PMBL-Linien. A) Zwei biologische Replikate (I und II) der MedB-1 Zelllinie nach Transduktion mit shBATF3 sind dargestellt. BATF3 ist in shBATF3-transduzierten MedB-1 herunterreguliert, allerdings zeigt sich keine Reduktion von MYC. Unter den Western-Blot-Analysen ist die prozentuale Ausprägung nach Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierte Zellen zu sehen. Die Größe des Proteinmarkers ist angegeben in kDa. B) qRT-PCR von shBATF3-transduzierten Karpas 1106P. Die prozentuale BATF3- und MYC-mRNA-Expression nach Normalisierung ist zu sehen. Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung für drei biologische Replikate dar. GFP⁺-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion sortiert (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.10 Überexpression von BATF3 kann die MYC-Ausprägung verstärken

Um zu klären, ob die gezielte Expression von BATF3 zur Ausprägung von MYC führen kann, wurde eine cHL-Zelllinie, die geringe BATF3-Level aufweist mit BATF3-exprimierenden Lentiviren infiziert. Der LeGO-iG2-Vektor exprimiert BATF3 zusammen mit GFP unter dem gleichen Promotor, dabei sind BATF3-cDNA und GFP durch eine *IRES*-Sequenz getrennt, so dass die Expression des GFP-Reporters die Expression der BATF3-Sequenz in voller Länge anzeigt (Kozak 2005). Die U-HO1 zeigt auf Proteinebene die geringste BATF3-Ausprägung der untersuchten cHL-Linien (Abbildung 2). Zusätzlich prägt sie im Vergleich zu den anderen cHL-Linien relativ moderate Level von MYC aus (Abbildung 21). Aus diesem Grund wurde U-HO1 ausgewählt, um BATF3-Überexpression zu induzieren. U-HO1-Zellen wurden mit den entsprechenden LeGO-iG2 Lentiviren infiziert und nach etwa 48 Stunden auf GFP-Positivität sortiert. Eine Leervektor-Kontrolle (eV-Kontrolle, engl. *empty vector*), welche anstatt der BATF3-cDNA keine Sequenz und nur den GFP-Marker enthält, wurde ebenfalls analysiert. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Western-Blots von zwei biologischen Replikaten dargestellt. In der Leervektor-Kontrolle ist kein BATF3-Protein detektierbar, hingegen zeigen U-HO1 mit BATF3-Überexpressionskonstrukt eine sehr starke Bande für BATF3. Die Überexpression von BATF3 resultiert in einer Bandenintensität, welche den gleichzeitigen Nachweis der schwachen endogenen BATF3-Expression in U-HO1 verhindert. Die Betrachtung der MYC-Expression nach Transduktion mit dem BATF3-Überexpressionskonstrukt zeigt eine verstärkte Ausprägung von MYC im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. So ist in nach Normalisierung auf ACTB und Leervektor-Kontrolle eine 1,2-fach und 1,7-fach verstärkte MYC-Expression festzustellen. Die Überexpression von BATF3 in der cHL-Linie U-HO1 führt somit zu einer verstärkten MYC-Ausprägung.

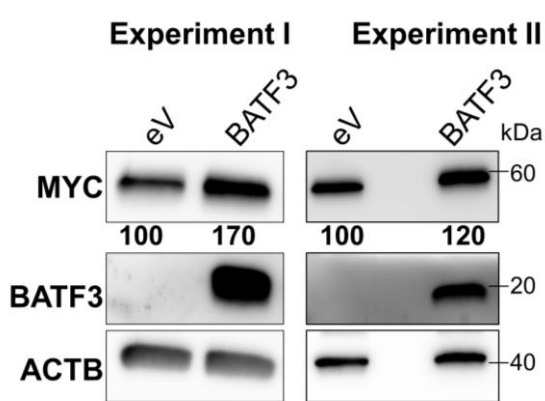


Abbildung 24: Expression von BATF3 kann MYC-Proteinlevel in der U-HO1 cHL-Linie verstärken. Die cHL-Zelllinie U-HO1, welche nur geringe endogene BATF3-Level aufweist, wurde mit BATF3-überexprimierenden Viren infiziert und etwa 48 Stunden nach der Transduktion sortiert. MYC-Proteinlevel wurden zur eV-Kontrolle (ohne Insert) und ACTB normalisiert. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. Unter dem MYC Western-Blot ist die prozentuale MYC-Ausprägung angegeben. Die Größe des Proteinmarkers ist angegeben in kDa (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.11 MYC ist ein direktes Zielgen von BATF3

Die konsistente Reduktion von MYC nach BATF3-Herunterregulation, wirft die Frage auf, ob *MYC* ein direktes Zielgen von BATF3 ist. Die nähere Betrachtung der genomischen Region von und um *MYC* zeigt eine AP-1-Erkennungsstelle in der *MYC*-Promotorsequenz (Iavarone et al. 2003).



Abbildung 25: Schematischer Ausschnitt der genomischen Region von MYC. Es sind Exon 1 und 2 zu sehen sowie die Sequenz der AP-1-Erkennungsstelle (verändert nach Lollies et al. 2017).

Aus diesem Grund wurden ChIP-Experimente mit anschließender qRT-PCR (ChIP-qRT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit einem BATF3- oder Kontroll-Antikörper wurden Proteine und daran gebundene DNA präzipitiert. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit *Primern* durchgeführt, die die AP-1-Erkennungsstelle im *MYC*-Promotor amplifizieren. Ein IgG-Antikörper dient als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden weitere *Primerpaare* hergestellt, die drei DNA-Abschnitte amplifizieren, die zwischen -6 kb und +13 kb von der AP-1-Sequenz im *MYC*-Promotor entfernt liegen und selber keine AP-1-Erkennungssequenz enthalten. Um gleiche PCR-Reaktionsbedingungen zu ermöglichen, besitzen die resultierenden PCR-Produkte alle etwa die gleiche Größe wie das AP-1-PCR-Produkt. Die cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 sowie die ALCL-Zelllinien Karpas 299 und SU-DHL-1 wurden für die ChIP-qRT-PCR verwendet. In der L-428 ist ein etwa 1,2-faches Signal für die AP-1-Erkennungssequenz im *MYC*-Promotor nach Normalisierung auf die sogenannte „Input“-Kontrolle festzustellen (Abbildung 26). Als „Input“-Kontrolle wird

eine DNA-Kontrolle bezeichnet, die vor Präzipitation und nach Fixierung und Lyse der Zellen abgenommen wird. Sie entspricht 10% der Ausgangsmenge an Zellmaterial vor Präzipitation mit dem entsprechenden Antikörper. Die Untersuchung der IgG (Isotypen)-Kontrolle zeigt nur ein 0,2-faches ChIP-Signal im Vergleich zur „Input“-Kontrolle. Die drei DNA-Kontrollsequenzen geben nur ein sehr schwaches ChIP-Signal, was in der BATF3- und IgG-Probe etwa gleich ist. Ein etwa 1,4-faches Signal zeigt die U-HO1 nach BATF3-ChIP im Vergleich zur „Input“-Kontrolle. Die IgG-Kontrolle gibt nur etwa ein 0,3-faches Signal nach Normalisierung auf die „Input“-Kontrolle. Die drei Kontroll-Produkte zeigen nur sehr schwache ChIP-Signale, die zwischen 0,04 und 0,1 liegen und zwischen BATF3-ChIP und IgG-ChIP kaum variieren. In den ALCL-Zelllinien ist ebenfalls ein stärkeres ChIP-Signal für die AP-1-Seite im *MYC*-Promotor in der BATF3-ChIP im Vergleich zur IgG-ChIP zu sehen. Die Karpas 299 zeigt ein 0,35-faches ChIP-Signal nach BATF3-ChIP im Vergleich zur „Input“-Kontrolle. Die Kontroll-ChIP weist nur ein 0,04-faches Signal nach Normalisierung zur „Input“-Kontrolle auf. Hier zeigen die Kontroll-PCR-Produkte ein leicht erhöhtes Signal in der BATF3-ChIP im Vergleich zur IgG-Kontrolle. Die Signale für die Kontroll-Produkte liegen hier bei 0,1 bis 0,2 nach BATF3-ChIP und für die IgG-ChIP zwischen 0,02 und 0,03. Die Analyse der SU-DHL-1-Zelllinie ergibt ChIP-Signalintensitäten von 1,2 nach BATF3-ChIP und Normalisierung zur „Input“-Kontrolle. Die IgG-Kontrolle zeigt ein ChIP-Signal von 0,2 nach Normalisierung, hingegen erreichen die Kontroll-PCR-Produkte nur Signalwerte von 0,05 und 0,1 nach Normalisierung. Es ist also festzustellen, dass nach BATF3-ChIP erhöhte Signale für die AP-1-Bindestelle im *MYC*-Promotor erkennbar sind. Für drei Kontrollstellen sowie in der IgG-Kontrolle sind keine vergleichbaren Signalintensitäten festzustellen. BATF3 bindet also spezifisch an die AP-1-Erkennungssequenz im *MYC*-Promotor.

Da BATF3 Komplexe mit JUN in cHL- und ALCL-Linien bilden kann (Abbildung 7) und außerdem in der murinen NIH-3T3 Fibroblasten-Linie JUN an die AP-1-Erkennungsstelle im *MYC*-Promotor bindet (Iavarone et al. 2003), wurde ebenfalls eine ChIP-qRT-PCR mit JUN durchgeführt. Hierzu wurden L-428- und U-HO1-Zellen verwendet. Als Kontrollregionen wurden die gleichen zu amplifizierenden genomischen Regionen wie für die BATF3-ChIP verwendet. In beiden cHL-Linien ist ein erhöhtes ChIP-Signal nach JUN-ChIP für die AP-1-Erkennungssequenz

festzustellen (Abbildung 26). Die Kontroll-PCR-Produkte zeigen für die JUN- und Kontroll-ChIP Werte, die unter einer Signalstärke von 0,1 nach Normalisierung liegen. Ebenfalls ist für die IgG-Kontrolle ein kaum detektierbares Signal ($<0,1$) für die AP-1-Erkennungsstelle im *MYC*-Promotor in beiden Zelllinien zu verzeichnen. Hingegen ist nach der JUN-ChIP für die AP-1-Erkennungsstelle des *MYC*-Promotors ein relatives Signal von etwa 2,1-fach in U-HO1 und von etwa 0,6-fach in L-428 zu detektieren. JUN erkennt also in den cHL-Linien L-428 und U-HO1 ebenso wie BATF3 die AP-1-Erkennungssequenz im *MYC*-Promotor und kann so die Expression von *MYC* regulieren.

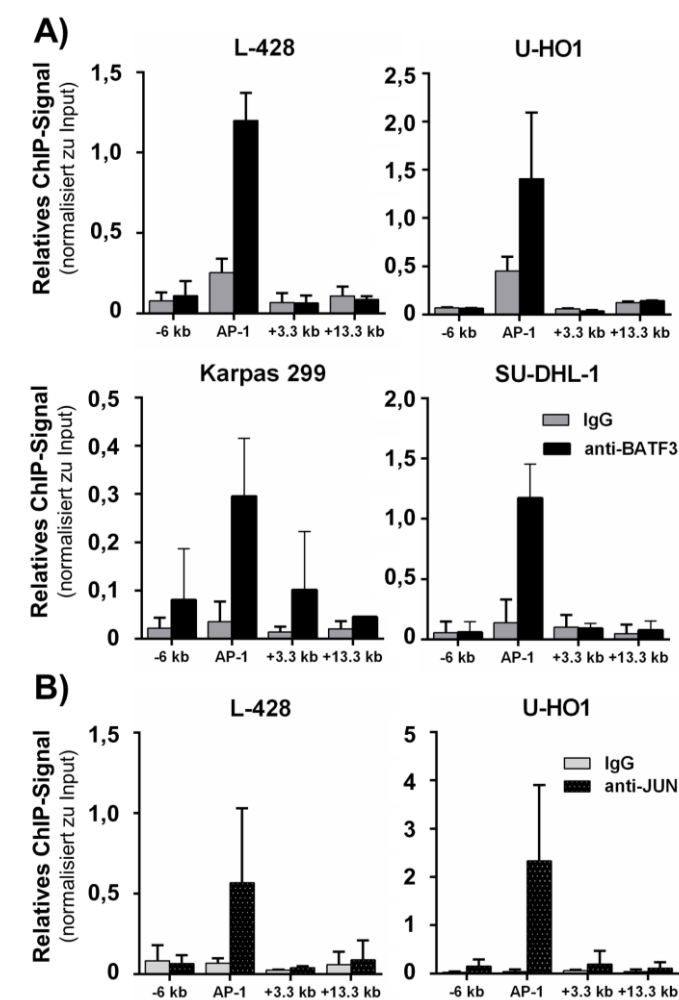


Abbildung 26: Bindung von BATF3 und JUN an eine AP-1-Erkennungssequenz im *MYC*-Promotor.

A) Für die cHL-Linien L-428 und U-HO1 und für die ALCL-Linien Karpas 299 und SR-786 wurde eine BATF3-ChIP mit anschließender qRT-PCR durchgeführt. In der qRT-PCR wurden neben einer AP-1-Erkennungsbindestelle, die sich in der *MYC*-Promotorregion befindet, auch drei Kontrollseiten ohne AP-1-Erkennungssequenzen analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein IgG-Antikörper verwendet. Drei biologische Replikate wurden pro Zelllinie untersucht. B) JUN-ChIP mit anschließender qRT-PCR für L-428 und U-HO1. Es wurden die gleichen Produkte wie nach BATF3-ChIP amplifiziert und analysiert. Ein IgG-Antikörper wurde als Negativkontrolle verwendet. Zwei biologische Replikate wurden angefertigt (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.12 BATF3-Expression nach *MYC*-Herunterregulation

Für die weitere Analyse wurde *MYC* in cHL- und ALCL-Zelllinien herunterreguliert, um festzustellen, ob *MYC* auch die Ausprägung von BATF3 regulieren kann. Dazu wurden Zelllinien mit Viren infiziert, die shRNAs gegen *MYC* enthalten. Es wurden

zwei verschiedene shRNAs gegen MYC verwendet. Die shRNA-Sequenzen gegen MYC wurden aus einer Studie von Rui et al. übernommen (Rui et al. 2010) und in den LeGO-Vektor kloniert. Die Klonierungen und die Produktion von shMYC-Viren wurden von Dr. Markus Schneider durchgeführt. Transduzierte Zellen wurden 3-4 Tage nach der Infektion sortiert und für die anschließende MYC- und BATF3-Proteinanalyse aufbereitet. HDLM-2, L-428, Karpas 299 und SR-786 wurden mit sh1MYC-, sh2MYC- oder shNT-Viren infiziert. In allen vier Zelllinien ist eine Herunterregulation von MYC zu verzeichnen (Abbildung 27). Nach Transduktion mit sh1MYC- oder sh2MYC-Viren regulieren HDLM-2 cHL-Zellen MYC-Level um etwa 50% herunter. Die Analyse der BATF3-Level zeigt eine Zunahme auf 274% und 349% nach Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierte HDLM-2. L-428-Zellen zeigen eine Herunterregulation der MYC-Expression auf rund 25% im Vergleich zur Kontrolle. Hier steigen die BATF3-Level auf 154% nach Transduktion mit sh1MYC und sinken auf 79% nach Transduktion mit sh2MYC. Sh1MYC-transduzierte Karpas 299 regulieren MYC auf 36% herunter und sh2MYC-transduzierte Karpas 299 haben nur noch 19% der MYC-Ausprägung nach Normalisierung. Die BATF3-Level sinken nach Herunterregulation von MYC auf 75% (sh1MYC) bzw. 51% (sh2MYC). SR-786 Zellen besitzen nach Transduktion mit sh1MYC-Viren nur noch 27% MYC-Protein und mit sh2MYC-Viren nur noch 14%. Die Untersuchung der BATF3-Level zeigt eine Zunahme der BATF3-Ausprägung auf 119% bzw. 189%. Die kompetitive Wachstumsanalyse zeigt eine deutliche Abnahme der GFP-positiven Zellen in der Mischkultur über einen Zeitraum von 21 Tagen (Abbildung 27). Die Herunterregulation von MYC ist also toxisch für cHL- und ALCL-Zelllinien wie auch schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Rui et al. 2010, Weilemann et al. 2015) (persönliche Kommunikation Dr. Markus Schneider). Allerdings hat die Herunterregulation von MYC keinen deutlichen und konsistenten Einfluss auf die BATF3-Ausprägung in cHL- und ALCL-Linien.

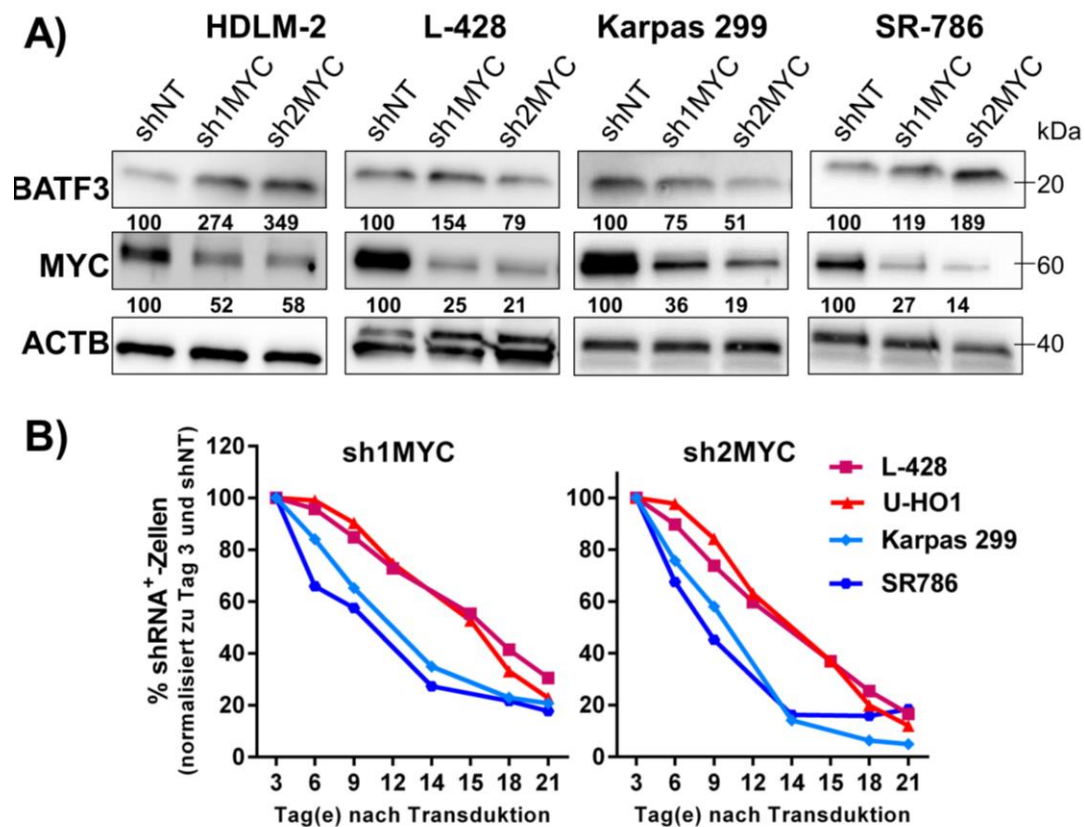


Abbildung 27: MYC-Herunterregulation und BATF3-Ausprägung in cHL- und ALCL-Linien. A) HDLM-2, L-428, Karpas 299 und SR-786 wurden mit shRNAs gegen MYC transduziert und GFP-positive Zellen wurden 3-4 Tage nach der Infektion sortiert. Die Western-Blot-Analyse veranschaulicht die Herunterregulation von MYC in den analysierten Zelllinien. Der prozentuale Anteil der MYC und BATF3-Level nach Normalisierung auf Kontrolle und ACTB sind unter den jeweiligen Western-Blots abgebildet. B) Die kompetitive Wachstumsanalyse zeigt eine starke Abnahme der GFP⁺-Zellen (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.13 IRF4 hat keinen Einfluss auf die MYC-Expression in cHL-Zelllinien

In ALCL-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von IRF4 eine Reduktion der MYC-Proteinlevel zur Folge hat (Weilemann et al. 2015). Auch wurde gezeigt, dass diese Regulation direkt durch Bindung von IRF4 an den *MYC*-Promotor geschieht. Um festzustellen, ob IRF4 auch in cHL-Zelllinien MYC-Expression reguliert, wurden shRNAs gegen IRF4 hergestellt und in den LeGO-Vektor kloniert. Hier wurde die gleiche Klonierungsstrategie wie für die shRNAs gegen BATF3 gewählt. Oligonukleotidsequenzen für die Herstellung von shRNAs gegen IRF4 wurden aus den publizierten Daten von Weilemann et al. 2015 übernommen. Außerdem wurden ALCL-Zelllinien mit shRNAs gegen IRF4 transduziert, um die Ausprägung von BATF3 nach IRF4-Herunterregulation zu analysieren. cHL- und

ALCL-Zelllinien wurden mit den entsprechenden LeGO-Viren infiziert und 3-4 Tage nach Transduktion wurden GFP⁺-Zellen sortiert. Anschließend wurden BATF3-, IRF4- und MYC-Level mit Western-Blot-Analyse angeschaut.

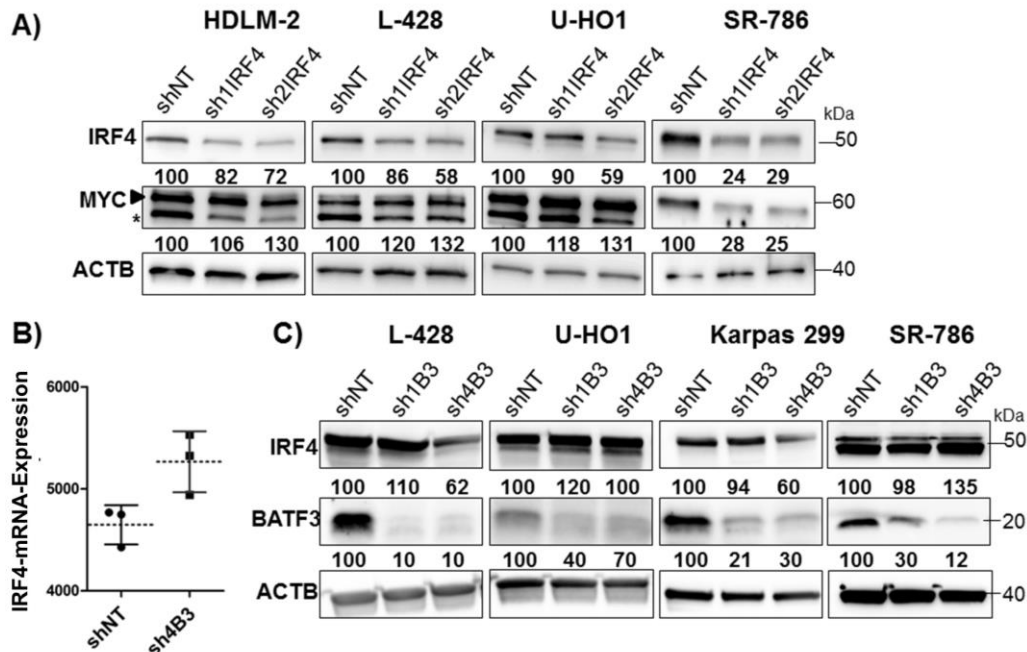


Abbildung 28: IRF4-Herunterregulation führt zur Reduktion von MYC in ALCL- nicht aber in cHL-Zelllinien. A) cHL- und ALCL-Linien wurden mit zwei verschiedenen shRNAs gegen IRF4 transduziert und 3-4 Tage nach der Infektion sortiert. Unter der jeweiligen Western-Blot Abbildung ist die prozentuale Expression nach Normalisierung dargestellt. B) IRF4-mRNA-Ausprägung in L-428-Zellen nach BATF3-Herunterregulation. C) Darstellung der IRF4-Proteinlevel nach BATF3-Herunterregulation in cHL- und ALCL-Linien. Die Normalisierung erfolgte auf ACTB und shNT-transduzierte Kontrollprobe. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

In allen shIRF4-transduzierten cHL-Linien ist eine Herunterregulation von IRF4 zu sehen (Abbildung 28). Allerdings ist in keiner der drei analysierten cHL-Linien eine Reduktion von MYC nach IRF4-Herunterregulation festzustellen. Bei HDLM-2 ist eine Reduktion der IRF4-Level in der sh1IRF4-transduzierten Probe auf 82% und in der sh2IRF4-transduzierten Probe auf 72% nach Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierte Kontrollzellen zu beobachten. Für MYC-Protein ist eine leicht erhöhte Ausprägung auf 106% in der sh1IRF4-transduzierten Probe und auf 130% in der sh2IRF4-transduzierten Probe zu erkennen. L-428 zeigt nach sh1IRF4-Transduktion eine Herunterregulation von IRF4 auf 86% und eine leicht verstärkte MYC-Expression auf 120% nach Normalisierung auf die Ladekontrolle ACTB und shNT-transduzierte Probe. In der sh2IRF4-transduzierten L-428 zeigt sich eine IRF4-Reduktion auf 58% und die MYC-Level sind kaum leicht angestiegen (132%) nach

Normalisierung auf ACTB und shNT-transduzierte L-428. Für U-HO1, die mit sh1IRF4-Viren infiziert wurden, reduziert sich IRF4 auf 90% und MYC steigt leicht auf 118% an. Sh2IRF4-transduzierte U-HO1 haben die IRF4-Level auf 59% reduziert und die MYC-Expression auf 131% erhöht. Für sh1IRF4-transduzierte SR-786 reduziert sich die IRF4-Ausprägung auf 24% und für MYC auf 28%. IRF4-Level reduzieren sich um etwa 70% und MYC-Level sogar um 75% in sh2IRF4-transduzierten SR-786. Somit reguliert IRF4 in ALCL-Linien die Ausprägung von MYC-Protein. Die publizierten Daten von Weilemann et al. können folglich bestätigt werden (Weilemann et al. 2015). Diese Beobachtung ist jedoch nicht für die cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 zutreffend. Hier sieht es eher so aus als würde MYC-Protein leicht ansteigen nach Herunterregulation von IRF4.

Zusätzlich wurde die Expression von IRF4 nach BATF3-Herunterregulation untersucht. Die GEP der shBATF3-transduzierten L-428 zeigen im Vergleich zur Kontrollprobe einen leichten Anstieg der IRF4-mRNA-Level (Abbildung 28). Dieser ist jedoch nicht signifikant. Ebenfalls lässt sich keine signifikante Veränderung der IRF4-Proteinlevel nach BATF3-Herunterregulation in der Western-Blot-Analyse feststellen (Abbildung 28). Sh1BATF3-transduzierte L-428 zeigen eine Zunahme von IRF4 auf 110% und sh2BATF3-transduzierte L-428 regulieren IRF4 auf 62% herunter. In U-HO1 ist ein leichter Anstieg auf 120% nach sh1BATF3-Transduktion und keine Veränderung nach sh4BATF3-Transduktion zu beobachten. Karpas 299 regulieren nach BATF3-Herunterregulation ebenfalls IRF4 leicht herunter und SR-786 zeigen nach sh1BATF3-Transduktion keine Veränderung der IRF4-Level. In Sh4BATF3-transduzierte SR-786 ist ein leichter Anstieg der IRF4-Level auf 135% zu verzeichnen. Die Herunterregulation von BATF3 führt in cHL- und ALCL-Zelllinien zu keinen signifikant veränderten IRF4-Expressionslevel.

3.14 CD30-Expression nach BATF3-Herunterregulation

Die (Ko-)Ausprägung von BATF3 in CD30⁺-Lymphomen, wirft die Frage auf, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen CD30- und BATF3-Expression besteht. In der Literatur lassen sich außerdem Hinweise darauf finden, dass AP-1-Faktoren die CD30-Expression regulieren können (Watanabe et al. 2003, Watanabe et al. 2005, Atsaves et al. 2014). Die durchflusszytometrische Analyse von cHL-Linien lässt eine deutliche Ausprägung von CD30 in drei der vier untersuchten cHL-Linien erkennen.

Im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle weist nur die cHL-Linie SUP-HD1 kaum detektierbare CD30-Level auf (Abbildung 29). Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression von CD30 nach Herunterregulation von BATF3 in cHL- und ALCL Zelllinien getestet. L-428, U-HO1 und Karpas 299 wurden nach Infektion mit shRNAs gegen BATF3 auf ihre CD30-Expression am Durchflusszytometer untersucht und es wurden drei biologische Replikate pro Zelllinie angefertigt. Zur Identifikation von erfolgreich transduzierten Zellen wurde die GFP-positive Population untersucht. Im Vergleich zu shNT-transduzierten Zellen zeigt keine der untersuchten Lymphom-Linien eine Veränderung in der CD30-Expression nach BATF3-Herunterregulation (Abbildung 29). Die Herunterregulation von BATF3 alleine führt also zu keiner Änderung der CD30-Ausprägung in cHL- und ALCL-Zelllinien.

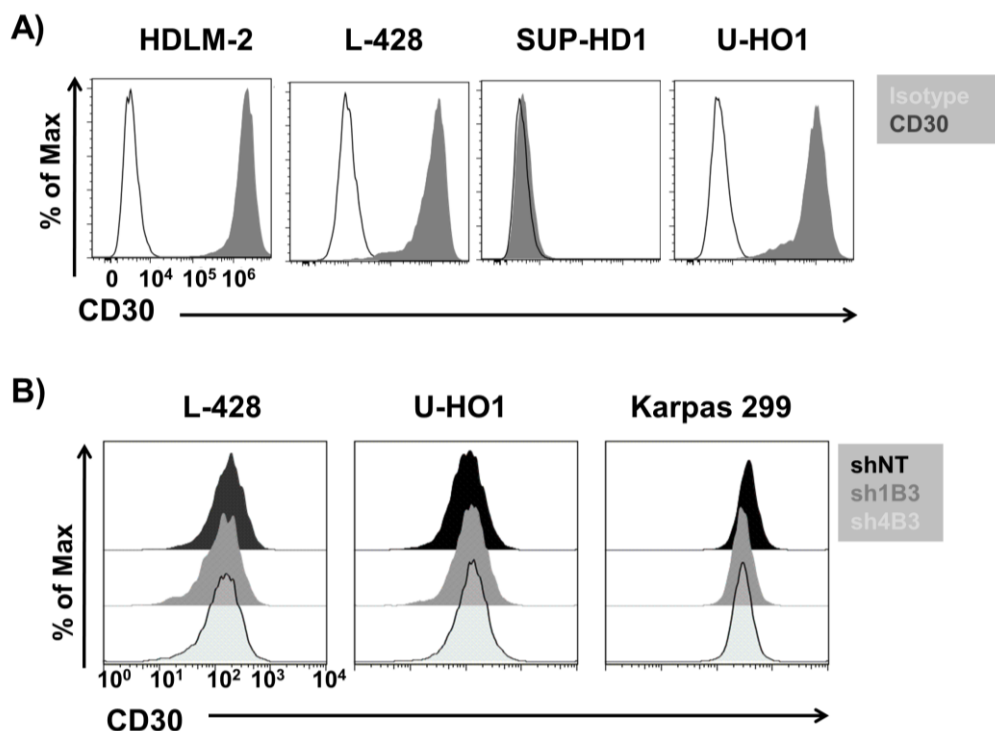


Abbildung 29: CD30-Ausprägung nach BATF3-Herunterregulation. A) CD30-Expression in cHL-Linien. Bis auf die SUP-HD1 zeigen alle untersuchten Linien starke CD30-Ausprägung. B) L-428, U-HO1 und Karpas 299 wurden 4 Tage nach Infektion mit shRNAs gegen BATF3 auf ihre CD30-Expression am Durchflusszytometer untersucht. Als Kontrolle wurden shNT-transduzierte Zellen verwendet. Pro Zelllinie wurden drei biologische Replikate durchgeführt (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.15 BATF3-Expression wird vom JAK/STAT-Signalweg reguliert

Aus vorherigen Publikationen ist bekannt, dass AP-1-Faktoren vom JAK/STAT-Signalweg in Lymphomen reguliert werden können (Ding et al. 2008, Lam et al. 2008, Crescenzo et al. 2015). Um der Frage nachzugehen, ob BATF3 auch im cHL, ALCL und PMBL vom JAK/STAT-Signalweg reguliert werden kann, wurde zunächst die Expression von BATF3 nach Inhibition des JAK/STAT-Signalweges untersucht. Zur Inhibition des JAK/STAT-Signalweges wurden zwei verschiedene JAK2-Inhibitoren getestet. Der erste JAK2-Inhibitor, TG101348, ist ein kompetitiver, hoch spezifischer Inhibitor von JAK2, der zur Behandlung von myeloproliferativen Erkrankungen eingesetzt wird (Pardanani et al. 2007a, Pardanani et al. 2007b, Pardanani 2011). Um eine geeignete Konzentration des Inhibitors anwenden zu können, wurden cHL-, ALCL- und PMBL-Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und mit Hilfe eines MTS-Assays konnte die metabolische Aktivität von behandelten mit unbehandelten Zellen verglichen werden (Abbildung 30). Konzentrationen bis 1,25 μM des JAK2-Inhibitors TG101348 haben kaum Einfluss auf die metabolische Aktivität von L-428 und U-HO1, was an der relativ konstanten OD deutlich wird. Im Bereich ab 2,5 μM TG101348 sinkt die OD und es ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität beider Zelllinien zu beobachten. Bei einer Konzentration von 20 μM ist die metabolische Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um etwa 40% bei beiden Zelllinien gesunken.

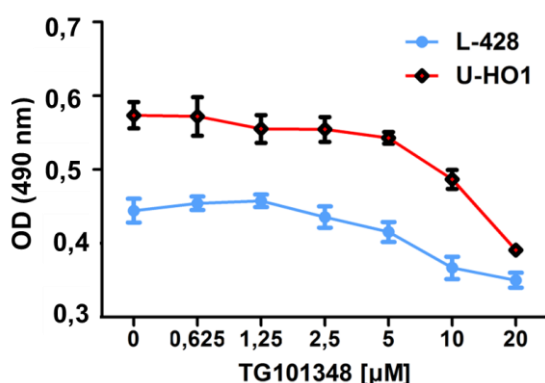


Abbildung 30: Messung der metabolischen Aktivität von cHL-Zelllinien nach Zugabe des JAK2-Inhibitors TG101348. L-428 und U-HO1 wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des JAK2-Inhibitors TG101348 behandelt. Anschließend wurde das MTS-Reagenz für 1 Stunde zu den Zellen hinzugefügt und die Absorption bei 490 nm gemessen. Eine reduzierte metabolische Aktivität ist anhand einer abnehmenden OD sichtbar.

Für TG101348 wurde nach Analyse der metabolischen Aktivität der Lymphom-Zellen ein Konzentrationsbereich von 0,25 bis 20 μM je nach Zelllinie gewählt. Der Inhibitor wurde für 24 Stunden zu den Zellen hinzugegeben und DMSO-behandelte Zellen

wurden als Kontrolle verwendet. Vor Inhibitorzugabe wurden die Zellen in ihrer optimalen Konzentration ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen abgenommen und für die anschließende Western-Blot-Analyse vorbereitet. Als Indikator für die erfolgreiche Inhibition von JAK2 wurde in cHL- und PMBL-Linien phosphoryliertes STAT6 (pSTAT6) verwendet. In Abbildung 31 ist die JAK2-Inhibition für die cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 zu sehen. Die Proteinexpression für pSTAT6 in allen untersuchten cHL-Linien veranschaulicht die stetige Abnahme von pSTAT6 mit steigenden Konzentrationen von TG101348. Für die cHL-Linien, ausgenommen HDLM-2, ist ebenfalls eine stetige Abnahme der BATF3-Proteinlevel mit ansteigender Inhibitorkonzentration zu sehen. ACTB und STAT6 dienen als Ladekontrolle. Für HDLM-2 ist nach Zugabe von 5 μ M TG101348 eine leichte Reduktion der BATF3-Level auf 74% zu sehen. Es wurde auf ACTB und Kontrollprobe normalisiert. Nach Zugabe von 10 μ M TG101348 liegen die BATF3-Level bei 83% und nach Zugabe von 20 μ M sinkt BATF3-Protein auf 50%. Die pSTAT6-Ausprägung ist nach Zugabe von 5, 10 und 20 μ M Inhibitor auf 20% gesunken. Für L-428 sinkt BATF3 nach Zugabe von 5 μ M TG101348 auf 39 %, nach 10 μ M Zugabe auf 29% und mit einer Behandlung von 20 μ M auf 9%. Die pSTAT6-Level sinken mit 5 μ M Inhibitorzugabe auf 23%, nach Zugabe von 10 μ M auf 15% und nach 20 μ M Zugabe auf 2%. Für die cHL-Linie U-HO1 reduziert sich BATF3 auf 35% und pSTAT6 auf 5% nach Zugabe von 5 μ M TG101348 und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 10 μ M Inhibitorzugabe ist BATF3-Protein auf 24% und pSTAT6 auf 5% gesunken. Eine Reduktion der BATF3-Proteinlevel auf 14% ist nach 20 μ M TG101348-Behandlung zu sehen. Die pSTAT6-Level sind mit dieser Inhibitorkonzentration auf 4% gesunken.

AZD1480 ist ein weiterer hoch spezifischer JAK2-Inhibitor (Hedvat et al. 2009), der ebenfalls getestet wurde. cHL- und PMBL-Zelllinien wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors für 24 Stunden behandelt und die Proteinausprägung von BATF3 und pSTAT6 wurde untersucht. Als Referenz dienen hier ebenfalls ACTB und STAT6. Sehr ähnlich zu dem Inhibitorversuch mit TG101348 zeigt AZD1480 einen Effekt auf die BATF3-Ausprägung in den cHL-Linien L-428 und U-HO1, allerdings ist keine Veränderung von BATF3 in HDLM-2 zu sehen (Abbildung 31). BATF3-Protein ist in HDLM-2 nach AZD1480-Behandlung mit 0,5 μ M und 5 μ M leicht reduziert, während 0,25 μ M und 10 μ M AZD1480 keine Veränderung der BATF3-

Level bewirken. Die Analyse der pSTAT6-Level nach AZD1480-Behandlung zeigt in der HDLM-2 Linie deutlich, dass die Inhibition von JAK2 gelungen ist, da pSTAT6 mit steigender AZD1480-Konzentration fast kontinuierlich abnimmt. In L-428 nehmen die pSTAT6- und BATF3-Level mit steigender AZD1480-Konzentration ab. Die Zugabe von 0,25 μM AZD1480 lässt BATF3-Level auf 92% und pSTAT6-Level auf 73% sinken. Werden 0,5 μM AZD1480 zu L-428 Zellen hinzugeben ist eine Abnahme der BATF3-Expression auf 87% festzustellen. Die Zugabe von 1 μM AZD1480 reduziert BATF3 auf 75% und pSTAT6 auf 53% und die Behandlung mit 5 μM AZD1480 lässt BATF3 auf 57% und pSTAT6 auf 8% sinken. U-HO1 zeigt eine noch stärkere Abnahme der BATF3-Level nach AZD1480-Behandlung als L-428. pSTAT6 nimmt hier mit steigender AZD1480-Konzentration kontinuierlich ab. BATF3-Protein zeigt eine Reduktion auf 63% nach Zugabe von 0,25 μM AZD1480 und eine weitere Abnahme von BATF3 auf 23% nach Zugabe von 0,5 μM . Wird 1 μM AZD1480 zu U-HO1-Zellen hinzugegeben sinkt BATF3 auf 26% und die Zugabe von 5 μM AZD1480 lässt BATF3 auf 33% absinken. Die PMBL-Linien Karpas 1106P und MedB-1 zeigen ebenfalls eine Reduktion der BATF3-Proteinlevel nach Behandlung mit AZD1480. In der PMBL-Linie Karpas 1106P reduzieren sich BATF3- und pSTAT6-Level nach Zugabe von 0,25 μM AZD1480 auf 91% bzw. 71%. Die Behandlung mit 0,5 μM AZD1480 führt zu einer Abnahme auf 37% für BATF3 und auf 76% für pSTAT6. BATF3-Protein sinkt weiter auf 49% nach Zugabe von 1 μM AZD1480 und auf 26% nach Zugabe von 5 μM AZD1480. Die BATF3- und pSTAT6-Level nehmen in MedB-1 nach AZD1480-Behandlung ebenfalls kontinuierlich ab. So besitzen die Zellen noch 32% der BATF3-Level und 23% der pSTAT6-Level nach Zugabe von 0,25 μM AZD1480. Die Zugabe von 0,5 μM AZD1480 lässt BATF3 weiter auf 17% und pSTAT6 auf 11% absinken und 1 μM AZD1480 führt zur Reduktion der BATF3-Level auf 15% und der pSTAT6-Level auf 4%. 5 μM des JAK2-Inhibitors reduzieren BATF3-Level weiter auf 14% und für pSTAT6 ist keine Bande mehr detektierbar.

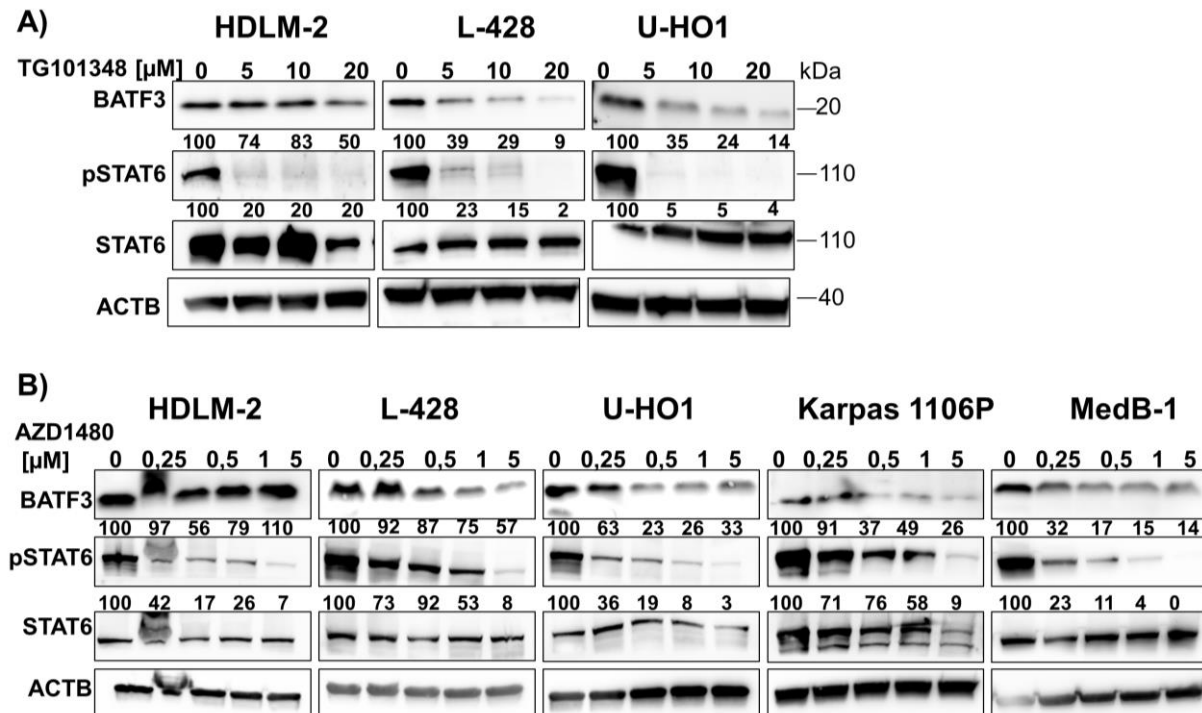


Abbildung 31. JAK2-Inhibition führt zur Herunterregulation von BATF3 in cHL- und PMBL-Linien. A) BATF3-Ausprägung nach Zugabe des JAK2-Inhibitors TG101348. pSTAT6 dient als Referenz für JAK2-Inhibition. STAT6 und ACTB wurden als Ladekontrolle verwendet. B) Darstellung der BATF3-Expression mit einem weiteren JAK2-Inhibitor, AZD1480, in cHL- und PMBL-Zelllinien. Die prozentuale BATF3- und pSTAT6-Ausprägung ist unter den jeweiligen Western-Blots abgebildet. Beide Inhibitoren wurden für 24 Stunden zu den Zellen hinzugegeben. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

ALCL-Zelllinien wurden ebenfalls mit dem JAK2-Inhibitor TG101348 behandelt (Abbildung 32). Basierend auf den Ergebnissen des MTS-Assays wurden für die ALCL-Zelllinien die Konzentrationen 1,25, 2,5, 5 und 10 µM gewählt und die Inhibitorzugabe wurde für 24 Stunden durchgeführt. Da ALCL-Linien kein pSTAT6 exprimieren sondern hauptsächlich pSTAT3 ausprägen (Skinnider et al. 2002a), wurde pSTAT3 als Indikator für JAK2-Inhibition verwendet. Die Analyse von Karpas 299 zeigt eine leichte Reduktion der BATF3- und pSTAT3-Level ab einer Behandlung mit 2,5 µM TG101348 und höher (Abbildung 32). So reduzieren sich BATF3-Level auf 91% und pSTAT3-Level auf 76% nach Zugabe von 2,5 µM TG101348. Nach Zugabe von 5 µM TG101348 sinken BATF3-Proteinlevel auf 84% und pSTAT3-Level auf 82%. Bei Behandlung mit 10 µM des JAK2-Inhibitors verbleiben noch 68% BATF3- und 40% pSTAT3-Protein. Bei SR-786 ist eine leichte Abnahme der BATF3- und pSTAT3-Level nach Inhibitorbehandlung zu beobachten, allerdings nehmen diese nicht kontinuierlich mit steigender TG101348-Zugabe ab. So ist eine Abnahme der pSTAT3-Level auf ungefähr 50% über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 1,25 µM bis 10 µM TG101348 zu erkennen. Ebenfalls

verbleiben die BATF3-Level bei rund 80% bei einer Inhibitorzugabe von 1,25, 2,5 und 5 μM . Lediglich bei einer Zugabe von 10 μM sinken BATF3-Level auf 25%, jedoch verbleiben die pSTAT3-Level bei 58%. Die Untersuchung der SU-DHL-1 nach TG101348 Behandlung zeigt ebenfalls keine kontinuierliche Abnahme der BATF3- und pSTAT3-Proteinlevel mit steigender Inhibitorkonzentration. Bei Zugabe von 1,25 und 2,5 μM TG101348 sinkt BATF3 auf 63% und 46% und pSTAT3 auf 87% und 63% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Werden 5 μM JAK2-Inhibitor hinzugefügt steigt BATF3 auf 114%, während pSTAT3 bei rund 60% verbleibt. Nach Behandlung mit 10 μM TG101348 sinkt BATF3 auf 35% und pSTAT3 auf 12% in SU-DHL-1 Zellen. Folglich ist die Behandlung mit dem JAK2-Inhibitor TG101348 in ALCL-Zelllinien erstens nicht sehr effizient, da keine konsistente pSTAT3-Reduktion mit steigender Inhibitorkonzentration feststellbar ist und zweitens sind keine eindeutigen Ergebnisse wie in den cHL- und PMBL-Zelllinien feststellbar, denn in keiner untersuchten ALCL-Linie ist eine kontinuierliche Abnahme von BATF3 mit steigender TG101348 Konzentration zu sehen.

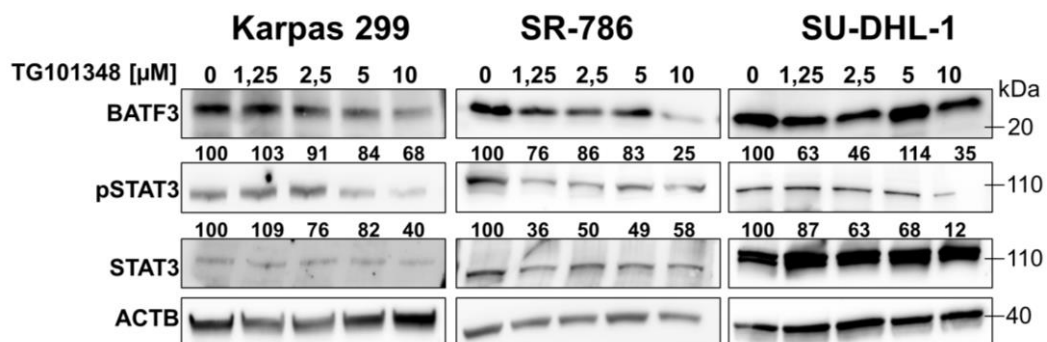


Abbildung 32: JAK2-Inhibition in ALCL-Zelllinien. Vier verschiedene Konzentrationen des JAK2-Inhibitors TG101348 wurden für 24 Stunden zu den ALCL-Zelllinien Karpas 299, SR-786 und SU-DHL-1 hinzugegeben. Die Ausprägung von BATF3 und pSTAT6 wurde quantifiziert und normalisiert zur DMSO-Kontrolle und ACTB. Repräsentative Abbildung für mindestens zwei biologische Replikate. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben.

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen pSTAT- und BATF3-Ausprägung wurden 16 primäre cHL-Fälle für pSTAT3 gefärbt (Tabelle 19). Die Färbungen wurden von Dr. Sylvia Hartmann am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main angefertigt. Aus Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass 15 der 16 cHL-Fälle (94%) positiv für pSTAT3 sind, wovon neun cHL-Fälle (56%) ebenfalls positiv für BATF3 sind. In der Literatur sind weitere Daten zu finden, welche die Ausprägung von pSTATs in primären cHL, ALCL und PMBL zeigen (Skinnider et al. 2002a, Scheeren et al. 2008, Rui et al. 2010, Ritz et al.

2013, Crescenzo et al. 2015). Zusätzlich wurden die Fälle noch für MYC gefärbt. Hier sind 13 von 16 cHL-Fällen (81%) positiv für MYC.

Tabelle 19: Zusammenfassung der IHC von BATF3, MYC und pSTAT3. 16 cHL-Fälle wurden gefärbt. Der EBV-Status ist ebenfalls angegeben.

cHL Fallnummer	EBV-Status	BATF3	MYC	pSTAT3
1	EBV-	+	+	+
2	EBV-	+	+	+
3	EBV-	-	+	+
4	EBV-	+	+	+
5	EBV-	+	+	+
6	EBV-	+	+	+
7	EBV-	+	+	+
8	EBV-	+	+	+
9	EBV+	-	+	+
10	EBV+	-	+	+
11	EBV+	-	-	+
12	EBV+	-	-	+
13	EBV+	-	+	+
14	EBV-	-	+	-
15	EBV-	+	-	+
16	EBV-	+	+	+

3.15.1 IL-13-Stimulation führt zur verstärkten BATF3-Expression in cHL-Zelllinien

Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass sich der JAK/STAT-Signalweg durch Zugabe von Interleukinen im cHL verstärken lässt (Kapp et al. 1999, Skinnider et al. 2002a). So kann die Zugabe von IL-13 beispielsweise pSTAT6 in cHL-Linien induzieren (Kapp et al. 1999, Skinnider et al. 2001). Um festzustellen, ob durch Zugabe von Interleukinen die BATF3-Expression in cHL und ALCL induziert bzw. verstärkt werden kann, wurden cHL-Linien mit IL-13 und ALCL-Linien mit IL-21 behandelt. Für ALCL-Linien wurde die Stimulation mit IL-21 gewählt, da eine vorherige Publikation die Induktion des JAK/STAT-Signalweges in ALCL-Zelllinien durch rekombinantes IL-21 zeigte und die Expression von IL-21 und IL-21-Rezeptor in primären ALK⁺-ALCL nachwies (Dien Bard et al. 2009). Die Zellen wurden 6 Stunden vor der Stimulation in serum-freiem Medium in ihrer optimalen Zelldichte ausgesät und für die cHL-Linien wurden 5 ng/μl rekombinantes IL-13 und für die ALCL-Linien 10

ng/μl rekombinates IL-21 hinzugegeben. Die BATF3- und pSTAT-Level wurden 30, 120 und 180 Minuten nach Stimulation gemessen. Die Δ Ct-Werte von BATF3 wurden zum Messzeitpunkt 0 normalisiert. TBP wurde als Ladekontrolle verwendet. Die qRT-PCR Auswertung ergibt für BATF3-mRNA-Level eine verstärkte Ausprägung bereits nach 30 Minuten-Stimulation. Die BATF3-Level steigen in L-1236 1,3-fach an, in L-428 1,2-fach und in U-HO1 etwa 2-fach an (Abbildung 33). Nach 120 Minuten sind die Level in L-1236 und U-HO1 auf etwa 2,4-fach angestiegen und in L-428 auf etwa 1,5-fach. Nach 180 Minuten sind die BATF3-mRNA-Level der L-428 weiter auf etwa 2,5-fach gestiegen, während die Expression in L-1236 und U-HO1 leicht abgesunken ist. L-1236 zeigt etwa eine 2,2-fache Ausprägung im Vergleich zum Zeitpunkt 0 und U-HO1 eine etwa 1,8-fache Expression. Für die Kontrolle der Induktion des JAK/STAT-Signalwegs durch IL-Stimulation wurden parallel aus dem gleichen Zellaliquot 1×10^5 Zellen für eine anschließende Western-Blot-Analyse der pSTAT-Level abgenommen. Diese konnten eine verstärkte pSTAT6-Expression in cHL-Zelllinien nach 30 Minuten zeigen. Durch die Stimulation mit IL-13 ist eine verstärkte BATF3-Ausprägung auf mRNA-Ebene in cHL-Linien ebenfalls nach 30 Minuten festzustellen. Um zu schauen, ob BATF3-Protein auch bereits nach 30 Minuten verstärkt ausgeprägt wird, wurden BATF3-Level mit Western-Blot analysiert. In allen drei untersuchten cHL-Linien, L-1236, L-428 und U-HO1, ist eine erhöhte Expression von BATF3 nach 30 Minuten sichtbar. BATF3-Level steigen in L-1236 auf 272% nach Normalisierung auf den Zeitpunkt 0 und ACTB. L-428 zeigt eine sehr leicht verstärkte Expression von 105% und in U-HO1 steigt BATF3 sogar auf 570%. Auffällig ist bei der cHL-Linie U-HO1, dass nach IL-13 Stimulation die BATF3-mRNA-Level um etwa die doppelte Menge ansteigen, während auf Proteinebene eine fast 6-fache Hochregulation festzustellen ist. Eine mögliche Erklärung könnte der Einfluss der Expositionszeit bei der Proteindetektion während der BATF3 Western-Blot-Analyse sein. Da das Proteinlevel in unstimulierten U-HO1 sehr gering ist, ist der Nachweis zum Zeitpunkt 0 schwierig und eventuell ineffizient, was die Quantifizierung der Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

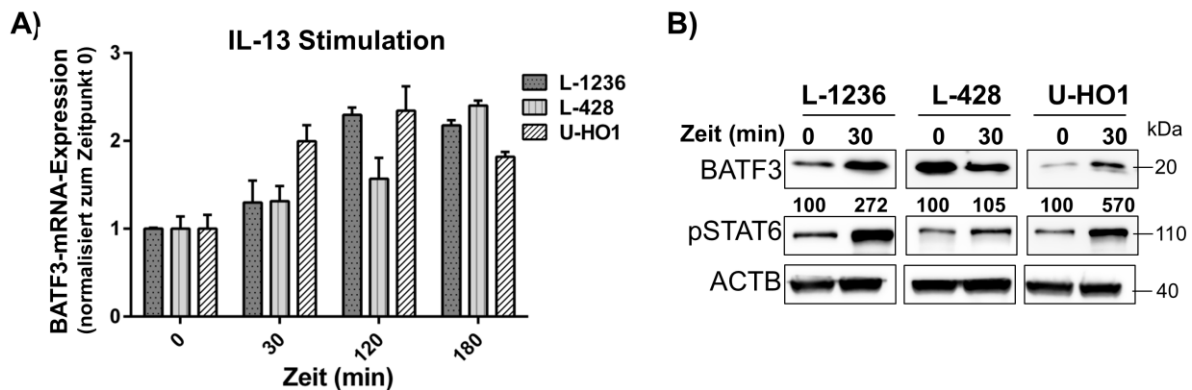


Abbildung 33: IL-13-Stimulation führt zur verstärkten BATF3-Ausprägung in cHL-Linien. A) qRT-PCR zur Analyse der BATF3-mRNA 30, 120 und 180 Minuten nach Zugabe von IL-13 in den cHL-Linien L-1236, L-428 und U-HO1. Die Zelllinien wurden 6 Stunden vor Stimulation in serum-freiem Medium ausgesät. B) BATF3-Proteinexpression nach IL-13-Stimulation in cHL-Linien. Es wurde auf Zeitpunkt 0 und ACTB normalisiert. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

Die Analyse der BATF3-Expression in ALCL-Linien zeigt eine leicht verstärkte Ausprägung nach 30 Minuten Stimulation in der Karpas 299 (Abbildung 34). In der SR-786 ist für alle drei Zeitpunkte eine leichte Abnahme der BATF3-Level zu sehen. So sinkt nach 30 Minuten die Expression auf etwa das 0,8-fache, nach 120 Minuten auf etwa das 0,7-fache und nach 180 Minuten ist nur noch die Hälfte der BATF3-mRNA vorhanden. Bei Karpas 299 erreicht die BATF3-Ausprägung nach 60 Minuten Stimulation wieder die Level des Zeitpunkts 0 und nach 120 Minuten liegt sie bei etwa 0,75-fach. Somit zeigt die Stimulation mit IL-21 in den beiden ALCL-Zelllinien keine verstärkte Ausprägung von BATF3. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich in cHL-Linien die BATF3-Ausprägung durch Stimulation mit IL-13 verstärken lässt, während die untersuchten ALCL-Linien keine verstärkte Expression nach Stimulation mit IL-21 zeigen. Diese Experimente verdeutlichen, dass der JAK/STAT-Signalweg im cHL die BATF3-Ausprägung reguliert und diese sich durch IL-13-Stimulation erhöhen lässt.



Abbildung 34: IL-21-Stimulation zur Untersuchung der BATF3-Ausprägung in ALCL-Zelllinien. qRT-PCR nach Zugabe von IL-21 in ALCL-Zelllinien. Dargestellt ist die BATF3-mRNA-Expression nach 30, 120 und 180 Minuten Stimulation. Die Zelllinien wurden 6 Stunden vor IL-21-Stimulation in serum-freien Medium ausgesät. pSTAT3-Proteinexpression wurde als Kontrolle für JAK/STAT-Signalwegaktivierung verwendet. Die Normalisierung zur Proteinquantifizierung erfolgte auf ACTB und auf den Zeitpunkt 0. Die Größe des Proteinmarkers ist in kDa angegeben (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.15.2 pSTATs binden an den *BATF3*-Promotor in cHL- und ALCL-Zelllinien

Die nähere Analyse des *BATF3*-Gens, speziell des Promotorbereichs, lässt verschiedene STAT-Erkennungssequenzen erkennen. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass STATs die *BATF3*-Expression direkt regulieren können. Zusätzlich zeigen die Inhibitorversuche mit TG101348 und AZD1480 sowie die Stimulation mit Interleukinen eine Regulation von *BATF3* durch den JAK/STAT-Signalweg (3.15). Aus diesem Grund wurde mittels ChIP-qRT-PCR untersucht, ob pSTATs direkt an *BATF3* binden können und so dessen Expression regulieren. Vier verschiedene Erkennungsstellen sind im *BATF3*-Gen für STATs zu finden (Abbildung 35, hier benannt als A, B und C) und so wurden *Primer* hergestellt, die genau diese vier Stellen amplifizieren.

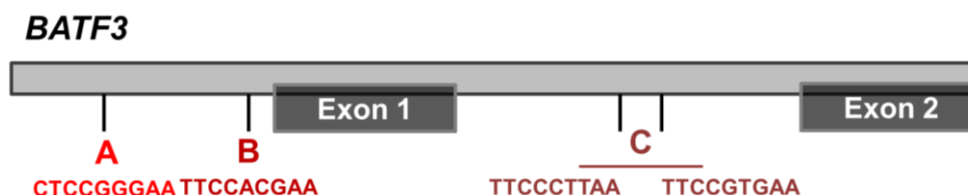


Abbildung 35: STAT-Erkennungssequenzen im *BATF3*-Gen. Vier verschiedene Erkennungsstellen für pSTATs (A, B und C) wurden für die ChIP-Analyse amplifiziert. Die Erkennungsstellen A und B enthalten jeweils eine putative STAT-Bindestelle und die Erkennungsstelle C beinhaltet zwei putative STAT-Bindestellen (verändert nach Lollies et al. 2017).

Da cHL-Linien pSTAT3, pSTAT5 und pSTAT6 exprimieren (Skninner et al. 2002a, Scheeren et al. 2008), wurden die ChIP-Experimente mit allen drei pSTAT-Faktoren durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein IgG-Antikörper verwendet. Die ChIP-Signale wurden zur „Input“-Kontrolle normalisiert. Dazu wurde wieder DNA verwendet, die vor Präzipitation und nach Fixierung und Lyse der Zellen abgenommen wurde. In L-428 ist ein verstärktes relatives ChIP-Signal nach pSTAT3- und pSTAT6-Präzipitation für alle drei Erkennungssequenzen zu verzeichnen (Abbildung 36). Die Erkennungsstelle A ist um etwa das 3,8-fache in der pSTAT3-IP der L-428 im Vergleich zur „Input“-Kontrolle angereichert. Erkennungsstelle B gibt ein etwa 2,5-faches ChIP-Signal für pSTAT3 und Erkennungsstelle C ein etwa 1,5-faches. Für pSTAT5 sind die Signale mit der IgG-Kontrolle vergleichbar und hier ist wahrscheinlich nur unspezifisch gebundene DNA amplifiziert worden. Für pSTAT6 ist in L-428 ein 1,8- bis 2,5-faches ChIP-Signal für alle drei Erkennungssequenzen feststellbar. Die Analyse von U-HO1 zeigt ein ähnliches Ergebnis. Hier sind die ChIP-Signale ebenfalls in der pSTAT3- und pSTAT6-Probe angereichert, während pSTAT5 vergleichbare Signale in der ChIP wie in der IgG-Kontrolle liefert. Für die Erkennungssequenzen B und C ist in U-HO1 ein 1,5-faches ChIP-Signal detektierbar und für Erkennungsstelle A ein etwa 0,9-faches ChIP-Signal nach pSTAT3-Präzipitation. Für pSTAT6 ist für die Erkennungsstelle A ein 0,9-faches ChIP-Signal zu verzeichnen und für Erkennungsstelle B und C ein etwa 1,2- bis 1,4-faches ChIP-Signal. Für HDLM-2 sind keine verstärkten ChIP-Signale nach Präzipitation mit pSTAT3 und pSTAT6 für alle drei Erkennungssequenzen zu erkennen. Hier liegen alle detektierten ChIP-Signale sogar unter den Signalen der IgG-Kontrolle. Da die beiden JAK2-Inhibitoren ebenfalls keine Effekte auf die BATF3-Expression in HDLM-2 zeigen (Abbildung 31), bestätigen die ChIP-Ergebnisse für HDLM-2 die vorherigen Beobachtungen. Hier findet keine Bindung von pSTAT3 und pSTAT6 an die drei Erkennungssequenzen im *BATF3*-Gen statt. In L-428 und U-HO1 ist eine Bindung von pSTAT3 und pSTAT6 an die drei Erkennungsstellen im *BATF3*-Gen zu sehen. Für ALCL-Linien wurden die ChIP-Experimente ebenfalls durchgeführt, allerdings wurde hier nur pSTAT3 als hauptsächlich aktiver STAT-Faktor im ALCL untersucht (Zamo et al. 2002, Crescenzo et al. 2015). Karpas 299 und SU-DHL-1 zeigen für alle drei Erkennungsstellen ein angereichertes ChIP-Signal im Vergleich zur Antikörperkontrolle. Erkennungsstelle A liefert ein 1,2-faches ChIP-Signal,

Erkennungsstelle B ein 1,3-faches und Erkennungsstelle C ein 0,9-faches Signal nach Normalisierung zur „Input“-Kontrolle. Die Signale der IgG-Kontrolle liegen alle bei etwa 0,1-fachem ChIP-Signal. In SU-DHL-1 ist ein 3,5-faches ChIP-Signal für die Erkennungsstelle A, ein 1,8-faches für die Erkennungsstelle B und ein 2,1-faches für die Erkennungsstelle C feststellbar. Die ChIP-Signale für die IgG-Kontrolle liegen hier für die drei Erkennungssequenzen bei $\leq 0,5$. In den ALCL-Linien Karpas 299 und SU-DHL-1 bindet pSTAT3 an die drei verschiedenen STAT-Erkennungssequenzen im *BATF3*-Gen. In cHL- und ALCL-Linien kann die Expression von *BATF3* also durch pSTATs reguliert werden. Somit konnte erstmals die Regulation von *BATF3* durch den JAK/STAT-Signalweg in cHL-, PMBL- und ALCL-Zelllinien gezeigt werden und dass diese Regulation durch die direkte Bindung von pSTATs an *BATF3* in cHL- und ALCL-Zelllinien geschieht.

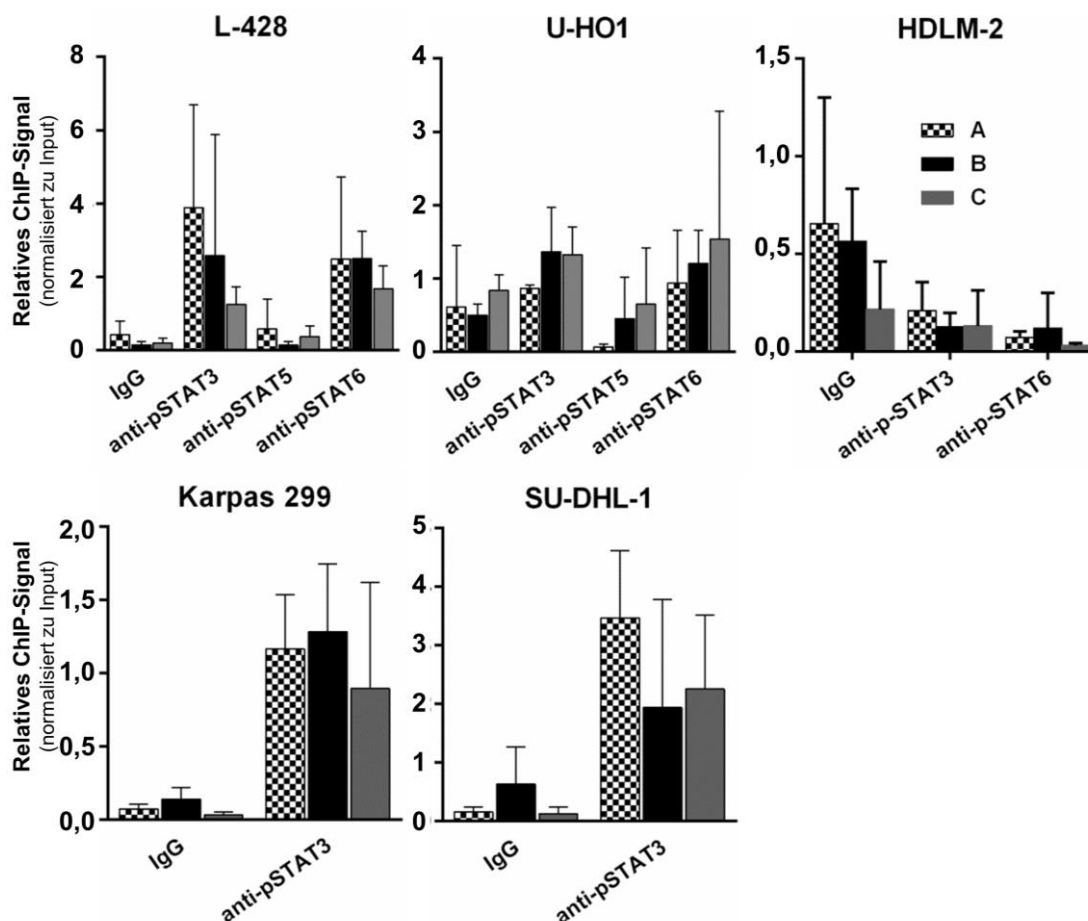


Abbildung 36: pSTATs binden an verschiedene Erkennungsstellen im *BATF3*-Gen. Drei verschiedene Erkennungsstellen (A, B und C) für pSTATs in *BATF3* wurden in cHL- und ALCL-Linien mittels ChIP-qRT-PCR angereichert und amplifiziert. Als Kontrolle wurde ein IgG-Antikörper verwendet. Die ChIP-Signale wurden zur „Input“-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte für drei biologische Replikate und deren Standardabweichungen (verändert nach Lollies et al. 2017).

3.16 Genetische Charakterisierung von Kombinationslymphomen

Frühere Studien haben gezeigt, dass Kombinationslymphome sehr oft klonal verwandt sind und für einige wenige Fälle sind gemeinsame sowie separate genetische Läsionen identifiziert worden (Bräuninger et al. 1999, Küppers et al. 2001b, van den Berg et al. 2002, Tinguely et al. 2003, Rosenquist et al. 2004b, Schmitz et al. 2005). Bisher gibt es allerdings keine Studien, die eine umfassende Charakterisierung von Kombinationslymphomen ermöglicht haben und genetische Läsionen sind nur für einzelne Gene beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun erste umfassende Analysen von Kombinationslymphomen mittels Exom-Sequenzierung durchgeführt werden.

3.16.1 IgV-Gen-Analysen zur Bestimmung der klonalen Verwandtschaft von Kombinationslymphomen

Oftmals bestehen Kombinationslymphome aus einem HL und einem NHL und besitzen einen B-Zell-Ursprung, welcher die Analyse der Ig-Gene der Tumorzellen erlaubt, da die umgelagerten IgV-Gene der B-Lymphozyten Auskunft über die klonale Verwandtschaft der Lymphome geben (Küppers et al. 2014). So lassen sich Aussagen über die Herkunft der Lymphome machen, da somatisch mutierte IgV-Gene auf GC-erfahrene B-Lymphozyten und unmutierte IgV-Gene auf Antigen-unerfahrene B-Lymphozyten hindeuten. Intraklonale Diversität innerhalb von B-Zell-Klonen ist die Folge der SHM im GC. Zur Untersuchung der klonalen Verwandtschaft beider Lymphome eines Kombinationslymphoms wurden die umgelagerten IgV-Gene charakterisiert. Dazu wurden mikrodisektierte oder sortierte Tumorzellen der beiden Lymphome mit Hilfe einer *seminested* Zwei-Runden-PCR auf IgV-Genumlagerungen analysiert. Umgelagerte IgV-Gene wurden mit Familien-spezifischen *Primern* (VH1-VH6 und V κ 1-V κ 4), die in der FR-I der Ig-Gene binden, und mit einer Mischung von verschiedenen J-Oligonukleotiden amplifiziert (Abbildung 37). Das resultierende PCR-Produkt liegt dann bei einer Größe von etwa 300 bis 350 bp. Als Positivkontrollen wurde DNA von monoklonalen B-Zelllinien mit bekannter IgV-Genumlagerung verwendet. Pro Lymphom wurden zehn verschiedene Zwei-Runden-PCRs für VH1 bis VH6 und V κ 1 bis V κ 4 durchgeführt. Von drei Kombinationslymphomen wurden die IgV-Genumlagerungen analysiert (Abbildung

39-41). Hierbei handelt es sich um Kombinationen von cHL und NHL. Zwei der drei untersuchten Kombinationslymphome zeigen klonale Verwandtschaft in der IgV-Gen-Analyse.

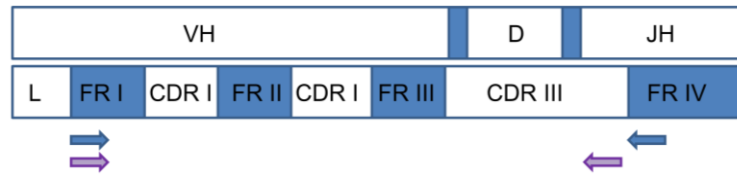


Abbildung 37: Schematische Darstellung der umgelagerten IgV-Gene. Die Pfeile deuten die Bindestellen der *Primer* für die erste (blaue Pfeile) und zweite Runde (violette Pfeile) der IgV-Gen-PCR an. L – Leitpeptidsequenz.

Der erste Fall stellt ein Kombinationslymphom aus einem cHL und einer CLL dar. Die Zellen wurden von Dr. Stephan Mathas und seinen Kollegen an der Charité in Berlin sortiert. Die Tumorzellen aus dem Knochenmark des Patienten wurden mit Fluoreszenz-markierten anti-CD30- und anti-CD4-Antikörpern gefärbt, um anschließend putative HRS-Zellen als $CD30^+CD4^-$ -Population sortieren zu können. Allerdings zeigt die Analyse der sortierten $CD30^+CD4^-$ -Zellen nur 52% Reinheit (Abbildung 38). CLL-Zellen wurden anhand ihrer $CD5^+$ - und $CD20^+$ -Expression identifiziert und angereichert (96,9% Reinheit). Als Nicht-Tumorzellen wurden $CD4^+$ -T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Patienten verwendet. 91,8% der Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten sind nach Dichtegradientenzentrifugation und $CD4$ -MACS positiv für $CD4$.

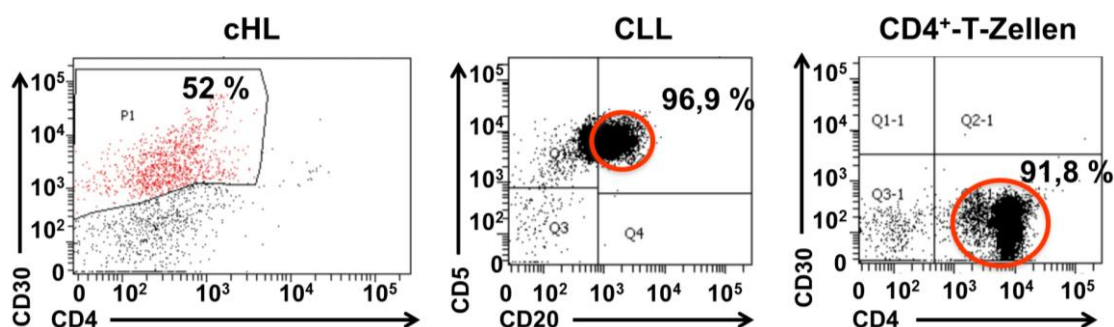


Abbildung 38: Analyse der sortierten (Tumor)zellen des ersten Kombinationslymphoms. HRS ($CD30^+CD4^-$)- und CLL ($CD20^+CD5^+$)-Zellen wurden aus dem Knochenmark des Patienten gewonnen. Als Nicht-Tumorzellen wurden T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut mit Hilfe eines $CD4$ -MACS angereichert. Der prozentuale Anteil der Tumor- und Nichttumorzell-Fraktion nach Sortierung bzw. MACS ist dargestellt.

Nach Isolation und Messung der DNA-Konzentration wurden etwa 50 pg DNA für die IgV-Gen-PCR eingesetzt, was rund zehn Zelläquivalenten entspricht. Die Tumor- und Nicht-Tumorzellen wurden in Duplikaten pipettiert. Die Analyse der IgVH-Gene zeigt

eine schwache Bande für VH1 in den HRS-Zellen sowie starke Produkte für VH1 in den CLL-Proben (Abbildung 39). In den CD4⁺-T-Zellen ist ebenfalls eine Bande bei etwa 350 bp zu erkennen. Die Positivkontrollen (PK, dargestellt in grün) der ersten und zweiten Runde der IgVH1-PCR ergeben ebenfalls eine Bande bei 350 bp. Die Negativkontrollen (NK, Nummer 9,10,13 und 14) der ersten und zweiten Runde zeigen kein Produkt. Die zusätzlichen Banden, welche in den VH-positiven PCRs zu erkennen sind, können durch JH-Gene verursacht werden. Für VH3 ist nur eine schwache Bande auf der richtigen Höhe in einer HRS-Zell-Probe und in der Positivkontrolle der zweiten Runde zu erkennen. Die HRS- und T-Zell-Proben der VH4-PCR liefern Produkte von einer Größe von etwa 350 bp. In den Tumor- und Nicht-Tumorproben sind allerdings zahlreiche Nebenprodukte zu erkennen. PCR-Produkte, die etwa der zu erwartenden Größe entsprechen, wurden aufgereinigt und zur Klonalitätsbestimmung der IgV-Gene sequenziert. Zur Untersuchung des Mutationszustandes der IgV-Region wurde die Mutationsfrequenz bestimmt. Dazu wurden ausschließlich somatische Mutationen berücksichtigt, welche vor der CDR-III-Region liegen, sodass N-Nukleotide, die während der V(D)J-Rekombination eingefügt wurden, ausgeschlossen werden konnten. Für die Mutationsfrequenz gilt: $\text{Mutationsfrequenz} = \text{Anzahl somatischer Mutationen} / \text{Gesamtanzahl der Nukleotide}$. Die Sequenzierung der IgV-PCR-Produkte zeigt ein monoklonales, produktives VH4-34 in den HRS-Zellen, welches eine Mutationsfrequenz von 7,3% aufweist. Des Weiteren lässt sich ein unmutiertes, monoklonales und produktives VH1-69 detektieren. Die V κ -Analyse ergibt Produkte für unmutiertes, monoklonales V κ 1-5 und V κ 2-30. Während die V κ 1-5-Genumlagerung produktiv ist, ist die V κ 2-30-Genumlagerung nicht im Leseraster und kodiert somit für keine produktive V κ -Genumlagerung. Die IgV-Gen-Analysen der CLL-Zellen ergeben unmutierte VH1-69-, V κ 1-5- und V κ 2-30-Genumlagerungen. Diese sind identisch mit den Genumlagerungen, die in den HRS-Zellen gefunden wurden. Da die sortierte HRS-Zell-Population nur eine Reinheit von etwa 52% besitzt, könnte es sein, dass sich in der sortierten HRS-Zell-Probe ebenfalls Tumorzellen der CLL befinden. Dafür spricht ebenfalls, dass beide Tumorzellproben aus dem Knochenmark isoliert wurden. Es kann zu diesem Zeitpunkt noch keine genaue Aussage über die klonale Verwandtschaft der Kombinationslymphome gemacht werden, da nur eine der beiden untersuchten HRS-Zell-Proben die VH4-34-Genumlagerung zeigt und diese

möglicherweise durch eine kontaminierende Post-GC-B-Zelle verursacht wurde. In den Nicht-Tumorzellen wurde nach Sanger-Sequenzierung unmutiertes VH3-21 und VH1-69 gefunden. Außerdem wurden V κ 2-30 und V κ 1-5 in der V κ -PCR der Nicht-Tumorzellen gefunden, was neben der VH1-69-Genumlagerung vermutlich durch kontaminierende CLL-Zellen verursacht wurde, da die Tumorzellen der CLL in der Regel auch im peripheren Blut anzutreffen sind.

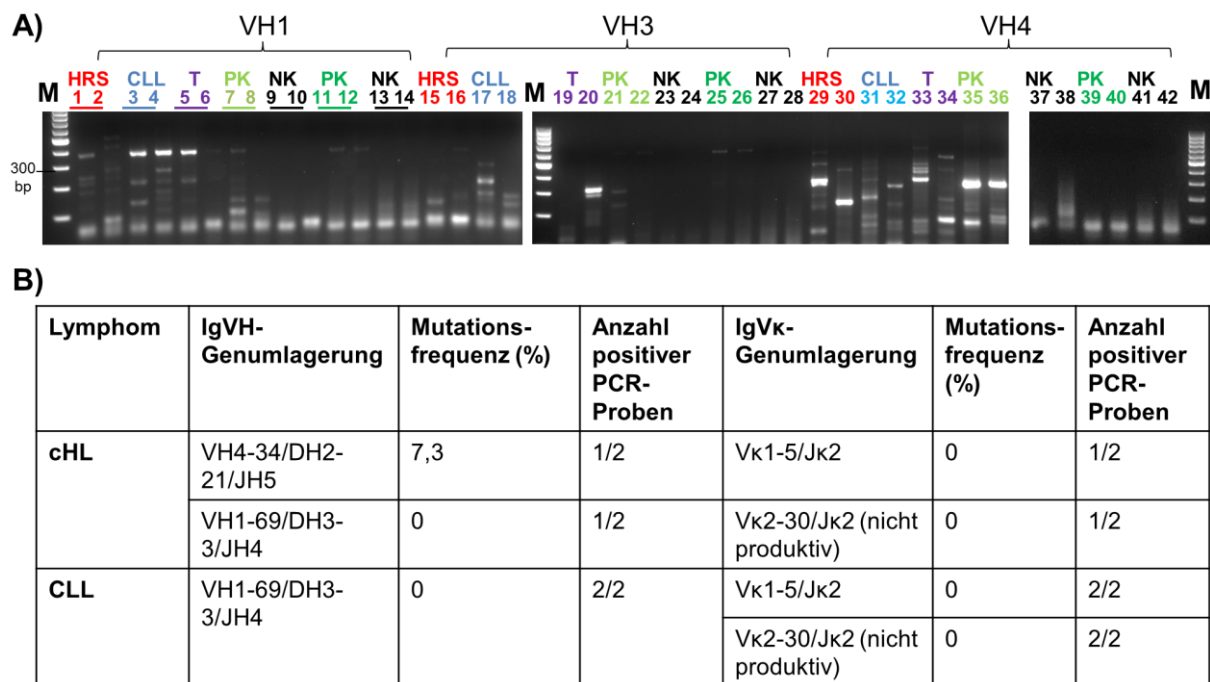


Abbildung 39: IgV-Genumlagerungen von HRS- und CLL-Zellen des ersten Kombinationslymphoms. A) Die Produkte der zweiten Runde der IgV-Gen-PCR wurden im Agarosegel aufgetrennt. Produkte, die der zu erwartenden Größe von etwa 300 bis 350 bp entsprechen, wurden ausgeschnitten und sequenziert. Als Positivkontrolle (PK) wurde die DNA von monoklonalen B-Zellen mit bekannter IgV-Genumlagerung verwendet. T – T-Zellen; M – Marker; NK – Negativkontrolle. B) Übersicht der identifizierten IgV-Genumlagerungen und der jeweiligen Mutationsfrequenzen der beiden Lymphome.

Das zweite untersuchte Kombinationslymphom besteht aus einem cHL und einem SMZL. Zur Isolation der HRS-Zellen wurden Lymphknotenschnitte hergestellt und neun Einzelzellen mikrodisektiert. HRS-Zellen wurden an Ihrer CD30-Expression und Morphologie erkannt. Zur Isolation von SMZL-Zellen wurden Gewebeschnitte der Milz angefertigt und diese zur Identifizierung der Tumorzellen mit CD20 gefärbt. Bei der Identifikation von Tumorzell-reichen Arealen in der Milz von CD20⁺-SMZL-Zellen leistete Dr. Sylvia Hartmann Hilfestellung. Von zwölf mikrodisektierten SMZL-Zellen besitzen sieben Zellen eine leicht mutierte, produktive VH3-23-Genumlagerung und fünf Tumorzellen zeigen ein mutiertes, produktives V κ 1-8 (Abbildung 40). Die Mutationsfrequenz beträgt für die VH3-23-Genumlagerung 2,8% und für die V κ 1-8-

Genumlagerung 2,3%. Die Mutationsfrequenz dieses Kombinationslymphoms liegt dabei unter der Mutationsfrequenz von „normalen“ GC-B-Zellen, welche bei etwa 5-6% liegt (Klein et al. 1998). 2/9 HRS-Zellen zeigen ebenfalls das identische VH3-23 Produkt und 3/9 HRS-Zellen die identische Vκ1-8-Genumlagerung. Die beiden Lymphome im zweiten Kombinationslymphom sind somit klonal verwandt. Das klonale VH3-23 und Vκ1-8 deutet auf einen gemeinsamen B-Zell-Ursprung/-Klon hin. Die genauere Untersuchung der klonalen IgV-Genumlagerungen zeigt für die leichte und schwere Kette eine identische Sequenz. Das gemeinsame Auftreten von mutierten IgV-Genen bei allerdings fehlender intraklonaler Diversität zeigt, dass die beiden Lymphome ihren Ursprung zwar aus GC-erfahrenen B-Zellen haben, möglicherweise aber keinem Prozess der andauernden SHM (engl. „*ongoing SHM*“) unterliegen und während der malignen Proliferation keine weitere Diversifizierung der IgV-Gene mehr stattgefunden hat.

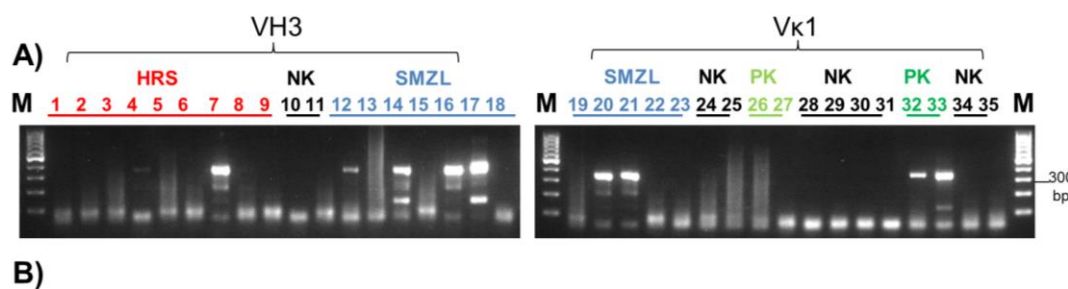
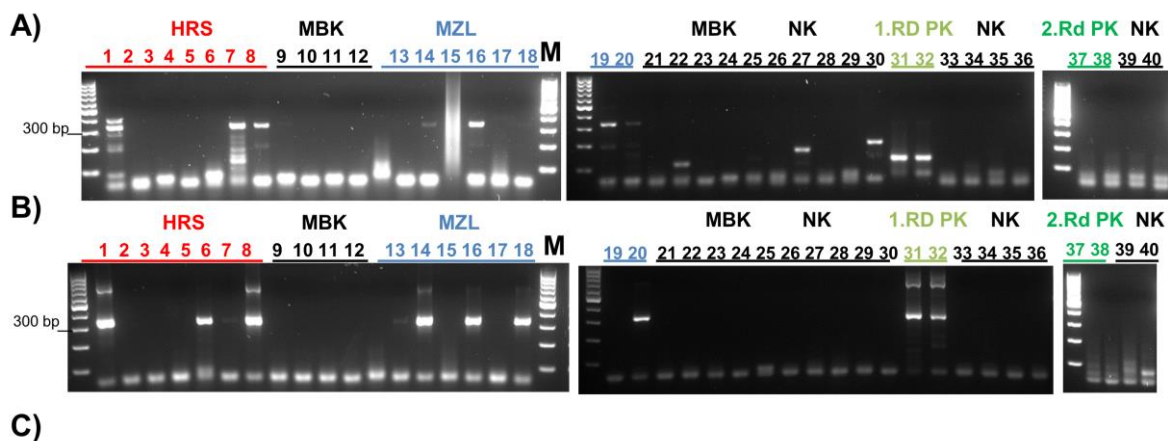


Abbildung 40: IgV-Genumlagerungen von HRS- und SMZL-Zellen des zweiten Kombinationslymphoms. A) Von mikrodisezierten Einzelzellen sind Produkte für VH3 auf der zu erwartenden Größe bei etwa 350 bp zu sehen. NK – Negativkontrolle; PK – Positivkontrollen der ersten und zweiten Runde der IgV-Gen-PCR; M – Marker. B) Genumlagerungen von IgVH und IgVκ der beiden Lymphome. Die Mutationsfrequenz zeigt leicht mutierte IgV-Gene des cHLs und SMZLs.

Das dritte Kombinationslymphom besteht aus einem cHL und einem MZL. Gewebeschnitte wurden für die Mikrodisektion mit einem anti-CD30-Antikörper gefärbt, um die HRS-Zellen zu identifizieren. Da die histologische Begutachtung des Kombinationslymphoms HRS-Zellen zeigte, die in einem definierten Bereich des Lymphknotens lagen, hingegen die MZL-Zellen diffus verstreut vorzufinden waren und einen Großteil der Zellen im Lymphknoten neben wenigen (T)-Lymphozyten

ausmachen, wurde für die Identifizierung der MZL-Zellen das Lymphknotengewebe mit CD3 gefärbt. CD3⁺-Zellen wurden als MZL-Zellen mikrodisektiert. Die IgV-Gen-Analyse von mikrodisektierten Einzelzellen des cHLs zeigt in 3/8 HRS-Zellen ein Produkt für VH3 (Abbildung 41). Die Analyse der κ -leichten Kette ergibt in 4/8 mikrodisektierten HRS-Zellen eine produktive V κ 1-16-Genumlagerung. In 4/8 mikrodisektierten MZL-Zellen sind identische IgV-Genumlagerungen für VH und in 5/8 MZL-Zellen für V κ zu detektieren. Die VH3-23-Genumlagerung in beiden Lymphomentitäten ist produktiv und mutiert (Mutationsfrequenz 4,8%), hingegen ist die V κ 1-16-Genumlagerung unmutiert. Das unmutierte V κ gibt Hinweise darauf, dass die VJ-Genumlagerung auf dem κ -Lokus nicht erfolgreich gewesen ist und der Tumorklon eine V λ -Genumlagerung besitzt. Da in der ersten Runde der IgV-Gen-PCR allerdings nur *Primer* hinzugefügt wurden, die den κ -Lokus der leichten Kette amplifizieren, kann mit diesen PCR-Produkten keine weitere Information über die Genumlagerung der λ -Kette gewonnen werden.



Lymphom	IgVH-Genumlagerung	Mutationsfrequenz (%)	Anzahl positiver PCR-Proben	IgV κ -Genumlagerung	Mutationsfrequenz (%)	Anzahl positiver PCR-Proben
cHL	VH3-23/DH2-2/JH4	4,8	3/8	V κ 1-16/J κ 3	0	4/8
MZL	VH3-23/DH2-2/JH4	4,8	4/8	V κ 1-16/J κ 3	0	5/8

Abbildung 41: IgV-Genumlagerungen von HRS- und MZL-Zellen des dritten Kombinationslymphoms. A) Dargestellt sind die PCR-Produkte nach der zweiten Runde der IgV-Gen-PCR mit VH3-spezifischen Primern. Pro Lymphom wurden acht Einzelzellen mikrodisektiert. B) Die PCR-Produkte nach einer IgV κ 1-PCR sind abgebildet. MBK – Membrankontrolle; NK – Negativkontrolle; M – Marker; PK – Positivkontrolle. C) Übersicht der IgVH- und IgV κ -Genumlagerungen der mikrodisektierten cHL- und MZL-Zellen.

3.16.2 Exom-Sequenzierung von Kombinationslymphomen

Da die Mikrodissektion der Kombinationslymphome 2 und 3 keine ausreichende DNA-Menge für eine anschließende Exom-Sequenzierung erbrachte, wurde die DNA mit Hilfe einer WGA amplifiziert. Die WGA wurde von Dr. Markus Schneider am Senkenbergischen Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Es wurden jeweils 3000 Tumor- und Nicht-Tumorzellen für die WGA mikrodissektiert. Aus volumentechnischen Gründen wurde die Reaktion der WGA aufgeteilt, sodass später pro Lymphom zwei oder drei Proben sequenziert wurden. Trotz höherer Sequenzierungskosten hat die Sequenzierung technischer Replikate den Vorteil, dass so mögliche Artefakte bzw. falsche Mutationen, die durch die WGA entstehen, besser erkannt werden können. Das erste Kombinationslymphom konnte ohne WGA sequenziert werden, da durch die Sortierung ausreichender Zellzahlen genügend DNA vorhanden war. Die Exom-Sequenzierung aller Kombinationslymphome wurde im BioChip-Labor von Dr. Ludger Klein-Hitpass durchgeführt. Anschließend wurden die Daten der sequenzierten Kombinationslymphome von Claudia Döring am Senkenbergischen Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main analysiert. Diese wurden mit dem Referenzgenom GRCH37 abgeglichen.

Eine allgemeine Übersicht der Exom-Sequenzierung der drei Kombinationslymphome ist in Tabelle 20 dargestellt. Der Vergleich der mittleren Abdeckung (*Coverage*) der Kombinationslymphome zeigt, dass Proben nach WGA eine höhere Abdeckung aufweisen als ohne WGA. So liegt die mittlere Abdeckung bei der cHL-Probe des ersten Kombinationslymphoms bei 30,5%, bei den CLL-Zellen bei 32,9% und bei den Nicht-Tumorzellen bei 43,0%. Im Gegensatz dazu ist die *Coverage* des zweiten Kombinationslymphoms, welches vor Sequenzierung eine WGA durchlaufen hat, wesentlich höher. Die cHL-Zellen zeigen eine mittlere Abdeckung von 60,6%, die SMZL-Zellen etwa 63,9% und die Nicht-Tumorzellen liegen bei 60,9%. Beim dritten Kombinationslymphom wurde die DNA ebenfalls mit WGA vermehrt und auch hier ist für die cHL-Zellen eine mittlere Abdeckung von 80,9% und für die Nicht-Tumorzellen eine *Coverage* von 79,0% festzustellen. Auffällig ist hier die schlechte Abdeckung der MZL-Zellen mit nur 26,3%. Mindestens 10 unterschiedliche Sequenzen pro angereicherte genomische Region sind durchschnittlich in 90,4% aller Genomregionen des ersten Kombinationslymphoms

vorzufinden. Durchschnittlich sind für 76,2% aller genomischen Regionen mindestens 20 unterschiedliche Sequenzen pro angereicherte Region im ersten Kombinationslymphom feststellbar. Beim zweiten Kombinationslymphom sind durchschnittlich 83,4% aller genomischen Regionen mit mindestens 10 unterschiedlichen Sequenzen abgedeckt und durchschnittlich 70,7% aller Regionen sind mit mindestens 20 unterschiedlichen Sequenzen vorzufinden. Durchschnittlich sind 75,4% der genomischen Regionen von mindestens 10 unterschiedlichen Sequenzen pro angereicherte Region im dritten Kombinationslymphom abgedeckt. Mindestens 20 unterschiedliche Sequenzen pro angereicherte genomische Region sind in durchschnittlich 62,2% aller Sequenzen zu finden.

Die Exome der drei Kombinationslymphome konnten erfolgreich sequenziert werden. Die *Coverage* ist in allen sequenzierten Fällen -unabhängig von der Durchführung einer WGA- durchaus gut. Lediglich eine Probe vom dritten Kombinationslymphom zeigt eine vergleichsweise schlechte Abdeckung der genomischen Regionen. Die sequenzierten Proben eignen sich für weitere Analysen wie die Untersuchung von genetischen Läsionen.

Tabelle 20: Allgemeine Statistik der Exom-Sequenzierung der untersuchten Kombinationslymphome. Für Tumor- und Nicht-Tumorzellen ist die prozentuale mittlere Abdeckung sowie der prozentuale Anteil der Sequenzen, die von mindestens 10 bzw. 20 unterschiedlichen Sequenzen pro genomische Region abgedeckt sind, dargestellt. Die Anzahl der abgeglichenen Sequenzen und der prozentuale Anteil der Sequenzen ohne Duplikate sind in den beiden rechten Spalten abgebildet.

Fall	Bezeichnung	mittlere Coverage	10x (%)	20x (%)	Anzahl Sequenzen [Mega]	Anteil Sequenzen ohne Duplikate (%)
1	cHL	30,5	90,1	73,8	53,2	63,1
1	CLL	32,9	89,0	72,1	51,8	82,5
1	NTZ	43,0	92,1	82,7	44,2	76,7
2	cHL	60,6	79,4	64,9	30,3	80,2
2	SMZL	63,9	86,0	74,7	30,9	81,0
2	NTZ	60,9	84,8	72,5	29,5	80,7
3	cHL	80,9	85,3	73,9	121,5	80,3
3	MZL	26,3	51,5	32,7	46,7	79,9
3	NTZ	79,0	89,5	80,0	126,3	81,9

3.16.3 Vorläufige Analyse genetischer Läsionen von Kombinationslymphomen

Nach erfolgreicher Exom-Sequenzierung erfolgte die Analyse der genetischen Läsionen der Kombinationslymphome. Es wurden nur Varianten in Betracht gezogen, die ausschließlich in den Lymphomzellen zu finden sind. Varianten, die in Nicht-Tumorzellen und Tumorzellen auftreten, wurden als Keimbahnmutationen bzw. -polymorphismen angesehen und nicht weiter untersucht. Mutationen, wie Insertionen, Deletionen, *Missense* und *Nonsense* Mutationen, die folglich einen direkten Einfluss auf die Proteinfunktion haben können, wurden für die weitere Analyse berücksichtigt. Synonyme Mutationen und Mutationen, die in intronischen Regionen oder im 5' und 3' untranslatierten Bereich der mRNA lagen, wurden herausgefiltert. Für die Auswertungen wurden nur Varianten ausgewählt, die eine *Coverage* von mindestens 20 für Tumor- und Nicht-Tumorzellen aufweisen und einen Qualitätswert von 30 besitzen. Der Qualitätswert beschreibt die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer Variante, d.h. je höher der Wert desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Variante. Ein Qualitätswert ermöglicht Aussagen über die Sequenzierqualität und beruht auf der sogenannten Phred-Skalierung (Ewing et al. 1998). Demnach beschreibt ein Wert von 30 eine Fehlerrate von 0,1% für eine falsch annotierte Base. Des Weiteren wurden bei der Auswertung nur Varianten in Betracht gezogen, die eine Allelfrequenz der Variante (engl. *Variant Allele Frequency*, VAF) von mindestens 0,1 bzw. 10% besitzen. Im Idealfall sind alle heterozygoten Mutationen mit einer VAF von 0,5 vorzufinden und als klonale Varianten anzusehen. Varianten mit einer VAF von etwa 0,25 werden als subklonale Mutationen angesehen, die nur in einem Teil der Tumor-Zell-Population auffindbar sind. Varianten, deren VAF kleiner als 0,1 sind, können später nur sehr schwierig validiert werden und darüber hinaus kann bei diesen seltenen Varianten nicht ausgeschlossen werden, dass es sich eventuell um Artefakte handelt, die z.B. durch Sequenzierfehler entstanden sind.

Die gefundenen Varianten der einzelnen Lymphome nach Anwendung der Filterkriterien sind in Tabelle 21 dargestellt. Im ersten Kombinationslymphom sind in den HRS-Zellen 186 und in den CLL-Zellen 280 Mutationen auffindbar. Beim zweiten Kombinationslymphom, dessen DNA vor Sequenzierung mittels WGA amplifiziert wurde, sind 1004 Varianten in den HRS- und 272 Varianten in den SMZL-Zellen zu

detektieren. Beim dritten Kombinationslymphom wurde ebenfalls eine WGA der DNA vor Exom-Sequenzierung und hier sind in den HRS-Zellen 990 Varianten und den MZL-Zellen 1223 Varianten zu finden.

Klonal verwandte Kombinationslymphome entstammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, deren Nachkommen sich im Laufe ihrer malignen Transformation sowohl durch gemeinsame als auch durch separate Mutationen in zwei verschiedene Lymphome entwickelt haben (Küppers et al. 2001b, Tinguely et al. 2003, Schmitz et al. 2005, Schneider et al. 2014). Eine Übersicht über die Anzahl gemeinsamer Mutationen der Kombinationslymphome ist zusätzlich in Tabelle 21 dargestellt. Beim ersten Kombinationslymphom, dessen klonale Verwandtschaft noch nicht vollständig geklärt ist, sind nur 24 gemeinsame Mutationen nach Exom-Sequenzierung zu detektieren. Beim klonal verwandten Kombinationslymphom 2 sind 41 gemeinsame Mutationen zu finden. Das dritte Kombinationslymphom, welches ebenfalls klonale Verwandtschaft durch identische IgV-Genumlagerungen zeigt, besitzt 38 gemeinsame Mutationen.

Tabelle 21: Anzahl genetischer Läsionen der drei untersuchten Kombinationslymphome. Es ist die Gesamtanzahl der genetischen Varianten pro Lymphom dargestellt. Zusätzlich sind gemeinsame Varianten, die in beiden Lymphomen gefunden wurden, abgebildet.

Fall	Lymphom	Mutationen/ Anzahl der Varianten
1	cHL	186
1	CLL	280
1	cHL und CLL	24
2	cHL	1004
2	SMZL	272
2	cHL und SMZL	41
3	cHL	990
3	MZL	1223
3	cHL und MZL	38

Um die in der Exom-Sequenzierung gefundenen Varianten validieren zu können, soll in weiteren Studien eine Multiplex-PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung von Tumor- und Nicht-Tumorzellen durchgeführt werden. Dazu soll nicht das gesamte Gen, sondern nur das mutierte Exon oder einen Teil des mutierten Exons, amplifiziert werden. Die Multiplex-PCR ist eine Zwei-Runden-PCR, bei der in der

ersten Runde mehrere *Primer*paare benutzt werden, die gleichzeitig mehrere mutierte Exons amplifizieren. In der zweiten Runde der PCR werden dann Oligonukleotide hinzugegeben, die spezifisch für einen mutierten genomischen Bereich des Gens von Interesse sind. Gene für Validierungsstudien wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1) Erfüllung aller Filterkriterien, d.h. somatische Mutationen, die zur Verschiebung des Leserasters oder zu vorzeitigen Stopp-Codons führen, 2) Gene, die bereits aus früheren Studien, als Krankheits-relevant beschrieben wurden, und 3) Gene, die eine Funktion in Zellproliferation, Apoptose, Lymphozytendifferenzierung, als epigenetische Regulatoren oder als wichtige Signalweg-Komponenten haben.

Eine vorläufige Auswahl von Varianten potentiell interessanter Gene sind in Tabelle 22 dargestellt. Es wurden Gene identifiziert und ausgewählt, die Mitglieder wichtiger Signalwege (z.B. NF κ B, JAK/STAT, NOTCH), epigenetische Regulatoren (KMT2D) und Zellzyklus-oder Apoptose-regulierende Gene (z.B. *TP53*, *FAS*) sind. Es wurden gemeinsame wie auch separate genetische Läsionen der beiden Lymphome ausgewählt. Als nächstes sollen spezifische *Primer*, die den mutierten Bereich amplifizieren, hergestellt werden, um die Multiplex-PCRs für die einzelnen Lymphome etablieren zu können. Von jedem Kombinationslymphom sollen Tumor- und Nicht-Tumorzellen für die Validierungsstudien mikrodisssektiert werden. Nicht-Tumorzellen sollen als Kontrolle dienen, da diese keine Mutation aufweisen sollten. Im Falle des ersten Kombinationslymphoms kann mit sortierten Zellen gearbeitet werden. Hier ist bereits DNA für die Validierung der Mutationen vorhanden.

Tabelle 22: Übersicht einiger ausgewählter Kandidatengene der drei Kombinationslymphome, die für Validierungsstudien in Betracht gezogen werden. Es sind gemeinsam auftretende Mutationen beider Lymphomzellen hervorgehoben. Neben der Allelfrequenz der Variante (VAF) und dem Qualitätswert ist auch die Konsequenz der jeweiligen Mutation dargestellt.

Fall	Lymphom	Gensymbol	VAF	Qualitätswert	Konsequenz	
1	cHL	HIST1H2BD	0,17	39	frameshift	Lys117GlyfsTer20
1	cHL	NOTCH4	0,27	38	frameshift	Asn1443SerfsTer14
1	cHL	CCNB2	0,30	50	missense	Gly212Val
1	cHL	MAP2K5	0,16	89	missense	Ala150Ser
1	cHL	PTPRK	0,17	33	missense	Phe108Leu
1	cHL	DCLRE1C	0,33	96	missense	Gly33Arg
1	CLL	CCND1	0,17	41	missense	Gln263Lys
1	CLL	FOS	0,23	36	missense	Ser364Arg
1	CLL	HDAC1	0,21	39	nonsense	Cys311Ter
1	CLL	IKBKB	0,25	35	missense	Glu39Asp
1	CLL	KMT2D	0,21	35	missense	Leu3747Ile
1	CLL	NOTCH3	0,35	32,5	frameshift	Arg1540HisfsTer22
2	cHL	FARSA	0,60	225	missense	Val430Met
2	cHL	PELI1	0,27	189	missense	Tyr342Cys
2	cHL	IL17RB	0,29	172	missense	Ile216Met
2	cHL	NOTCH4	0,20	30	missense	Trp1042Leu
2	cHL	TNFSF15	0,33	49	nonsense	Glu11Ter
2	cHL	TYK2	0,30	151	missense	Ser790Arg
2	SMZL	FAS	0,48	225	nonsense	Trp281Ter
2	SMZL	NFKB1	0,15	25	missense	His143Gln
2	SMZL	NOTCH2	0,18	35	nonsense	Arg2400Ter
2	SMZL	PTPRC	0,31	140	missense	Met475Ile
2	SMZL	EXOSC8	0,67	207	missense	Val51Met
2	SMZL	IRX5	0,31	176	missense	Lys470Arg
3	cHL	TP53	0,48	222	missense	Arg273His
3	cHL	KMT2B	0,24	120	missense	Ala684Ser
3	cHL	CSF1R	0,21	107	missense	Met149Thr
3	cHL	FOXO1	0,18	70	missense	Gly208Ser
3	cHL	JAK3	0,17	176	missense	Ser675Asn
3	cHL	CASP5	0,16	142	missense	Leu443Ile
3	MZL	STAT2	0,29	222	missense	Glu232Lys
3	MZL	CDK16	0,29	179	missense	Ile258Val
3	MZL	CD80	0,35	222	missense	Val254Leu
3	MZL	DNMT3B	0,29	222	missense	Ala142Val
3	MZL	TLR5	0,27	186	missense	Pro683Leu
3	MZL	NOTCH2	0,22	118	missense	Thr1945Asn

4 Diskussion

4.1 Rolle des AP-1-Transkriptionsfaktors BATF3 in der Pathogenese von CD30⁺-Lymphomen

Konstitutiv aktive Signalwege als Folge deregulierter Transkriptionsfaktor-Netzwerke spielen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation von Lymphomen. Die HRS-Zellen des cHLs prägen ein großes Repertoire an Transkriptionsfaktoren verschiedener Zellen hämatopoetischen Ursprungs aus, die zum Verlust des B-Zell-Phänotyps beitragen und zu aberranter Aktivität von verschiedenen Signalwegen führen. Auch wenn das HL innerhalb der Lymphome eine eigene Klassifikation besitzt, hat es Gemeinsamkeiten insbesondere zu zwei Formen von NHL, dem ALCL und dem PMBL. So sind die Tumorzellen dieser drei Lymphome durch CD30-Expression auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet und zeigen starke Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade. Ein weiteres Merkmal ist die Ausprägung von AP-1 (Mathas et al. 2002, Rosenwald et al. 2003, Watanabe et al. 2003, Janz et al. 2006b, Eckerle et al. 2009, Mathas et al. 2009).

4.1.1 Ausprägung und Interaktion von BATF3 mit AP-1- und IRF-Faktoren in CD30⁺-Lymphozyten und Lymphomzellen

Der AP-1-Transkriptionsfaktor BATF3 wurde auf mRNA-Ebene als eines der am stärksten ausgeprägten Gene im cHL und PMBL beschrieben (Rosenwald et al. 2003, Schwering et al. 2003b). Da es bisher keine Daten zur Proteinausprägung von BATF3 im cHL und PMBL gab, wurden immunhistochemische Färbungen und Western-Blot-Analysen angefertigt, die BATF3-Protein im cHL, PMBL und CD30⁺-DLBCL nachweisen konnten (Abbildung 1). Im ALCL beschrieben Eckerle und Kollegen BATF3-Protein in 40 von 40 immunhistochemisch gefärbten Fällen (Eckerle et al. 2009). Die weitere funktionelle Charakterisierung von BATF3 wurde auf cHL-, ALCL- und PMBL-Linien beschränkt. Die Gruppe der CD30⁺-DLBCL machen nur etwa 10-15% aller DLBCL aus und die Funktion von CD30 im DLBCL ist bisher unklar (Hu et al. 2013, Hao et al. 2015). Darüber hinaus stehen keine CD30⁺-DLBCL-Zelllinien zur Verfügung, die für funktionelle Charakterisierungen benötigt würden.

Das parallele Auftreten von CD30 und BATF3 in Lymphomen, hat die Frage aufgeworfen, ob „normale“ CD30⁺-Lymphozyten auch BATF3 ausdrücken. CD30 ist ein Transmembranprotein, das zur Familie der TNFR gehört (Falini et al. 1995) und auf den Tumorzellen des PMBLs, ALCLs und cHLs ausgeprägt wird. Die Expression von CD30 im hämatopoetischen System ist allerdings auf wenige aktivierte T- und B-Lymphozyten beschränkt (Stein et al. 1985). Die Untersuchung der tonsillären CD30⁺-B-Lymphozyten zeigt verstärkte BATF3-mRNA in den CD30-ausprägenden B-Lymphozyten im Vergleich zu anderen B-Zell-Populationen. Die Analyse publizierter Daten identifizierte erhöhte BATF3-mRNA in tonsillären CD30⁺-T-Lymphozyten im Vergleich zu CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten (Eckerle et al. 2009). Die Assoziation von CD30 und BATF3 ist somit nicht nur auf maligne Zellen beschränkt, sondern auch in normalen B- und T-Lymphozyten zu erkennen (Abbildung 4). BATF3 scheint keine Auswirkungen auf die CD30-Expression im cHL und ALCL zu haben, da die Analyse von BATF3-herunterregulierenden cHL- und ALCL-Zellen keine Veränderung in der CD30-Ausprägung im Vergleich zu shNT-transduzierten Zellen zeigt (Abbildung 29). Ob hingegen CD30 die Expression von BATF3 im cHL, ALCL und PMBL reguliert, könnte mittels shRNA gegen CD30 untersucht werden. Darüber hinaus könnte die ektopische Expression von CD30 in „normalen“ B-Lymphozyten zeigen, ob eine Induktion von BATF3 durch CD30 möglich ist. Bei der Untersuchung der funktionellen Relevanz von CD30 und BATF3 ist außerdem zu berücksichtigen, dass Unterschiede in der CD30-Signalaktivität in primären Zellen und in kultivierten Zellen, die unabhängig von ihrem Mikromilieu geworden sind, vorliegen. Studien zur Funktion von CD30 im ALCL und cHL zeigen, dass die Stimulation von CD30 in ALCL-Zelllinien zum Zelltod führt und eine Reihe von Änderungen in der globalen Genexpression der Zellen verursacht. (Mir et al. 2000, Hirsch et al. 2008). In cHL-Zelllinien sind keine Effekte auf das Überleben der Zellen nach CD30-Stimulation feststellbar und ebenso sind keine Unterschiede in der Genexpression der Zellen zu erkennen (Mir et al. 2000, Hirsch et al. 2008). Im ALCL wird die CD30-Ausprägung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus reguliert. So induziert CD30 die Aktivität der NFκB-Untereinheiten p52 und RELA, die die IRF4-Expression steuern, welches wiederum die CD30-Transkription reguliert (Boddicker et al. 2015). Im ALCL bindet JUNB an den *CD30*-Promotor und reguliert die Expression von CD30 in ALK⁺-ALCL-Linien (Watanabe et al. 2005, Atsaves et al. 2014). Demnach wäre es möglich,

dass andere AP-1-Faktoren in BATF3-positiven Zellen die Ausprägung von CD30 steuern.

Die Western-Blot-Analyse von HL- und NHL-Zelllinien zeigt eine starke Expression von BATF3 und den AP-1-Faktoren JUN und JUNB in CD30⁺-Lymphom-Zelllinien (Abbildung 2). In CD30⁻-NHL-Linien sind diese drei AP-1-Faktoren gar nicht bis sehr schwach ausgeprägt. Die CD30⁻-ABC-DLBCL-Linie Oci-Ly3 bildet die einzige Ausnahme in den untersuchten Lymphom-Zelllinien, da sie starke BATF3, JUN und JUNB Expression zeigt. Die Oci-Ly3-Zelllinie besitzt zwar kein CD30, allerdings weist sie einige Gemeinsamkeiten mit dem cHL im Hinblick auf konstitutiv aktive Signalwege, wie z.B. JAK/STAT und NFκB auf (Ding et al. 2008, Lam et al. 2008, Ngo et al. 2011). Darüber hinaus haben einige andere Studien die Ausprägung von AP-1-Faktoren in weiteren ABC-DLBCL-Zelllinien beschrieben (Blonska et al. 2015, Juilland et al. 2016). In den ABC-DLBCL-Linien HBL-1, Oci-Ly10 und TMD8 sind JUN, JUNB und JUND ausgeprägt und formen Heterodimere mit ATF-Faktoren (Juilland et al. 2016). So könnte aktives JAK/STAT zur Ausprägung von BATF3 in Oci-Ly3 führen. Da die Promotorregion von *BATF3* auch Erkennungsbindestellen für NFκB enthält, könnte die starke NFκB-Signatur in der Oci-Ly3-Zelllinie ebenfalls BATF3 induzieren. BATF3 ist als aktiver Transkriptionsfaktor in der nukleären Zellfraktion von cHL- und ALCL-Zelllinien zu finden und reguliert dort die Transkription durch Bindung an DNA-Erkennungssequenzen im Zusammenspiel mit anderen AP-1-Faktoren und IRFs (3.4 und 3.5); (Ise et al. 2011, Glasmacher et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). So konnte für das cHL und das ALCL mittels IP erstmals gezeigt werden, dass BATF3 mit JUN und JUNB in den cHL-Linien HDLM-2 und L-428 und den ALCL-Linien Karpas 299 und SR-786 Komplexe bildet (3.5). Studien haben gezeigt, dass BATFs mit IRFs interagieren und die Transkription regulieren können, allerdings findet die Interaktion zwischen IRFs und BATFs nur über drei Aminosäuren statt und ist daher sehr instabil (Li et al. 2012, Tussiwand et al. 2012). Auch wenn die massenspektrometrische Analyse des BATF3-Immunpräzipitats eine leichte Anreicherung von IRF4 ergab, konnte im BATF3-Präzipitat von L-428 und SR-786 keine Bande für IRF4 detektiert werden. Eine mögliche Interaktion kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden, da die angewandten Versuchsbedingungen wahrscheinlich zu stringent waren und ein optimiertes Protokoll mit milderer Waschschritten solche schwachen Interaktionen

eher erhalten könnte. In der massenspektrometrischen Analyse ist auch IRF5 leicht angereichert vorzufinden. Studien von Kreher et al. haben eine zentrale Funktion von IRF5 in der Pathogenese des cHLs aufgezeigt. IRF5 interagiert mit NF κ B und die Induktion von IRF5 in B-Zellen führt zur Expression verschiedener Zytokine und auch AP-1-Faktoren (Kreher et al. 2014). Somit bleibt die Frage nach dem interagierenden Faktor, welcher zusammen mit BATF3 und JUN(B) in cHL- und ALCL-Zelllinien eine positive Regulation verschiedenster Zielgene übernimmt, offen. IRF4 und IRF5 sind potentielle Kandidaten, die als Interaktionspartner von BATF3 in Frage kommen.

4.1.2 Assoziation von EBV-Status und BATF3-Expression

Der Grund für die inverse Korrelation von EBV und BATF3 in HRS-Zellen ist derzeit unklar. Publierte Daten von Steidl et al. stimmen mit den Daten der IHC überein und zeigen ebenfalls eine stärkere BATF3-mRNA-Ausprägung in EBV-negativen cHL-Fällen (Steidl et al. 2012). Allerdings zeigen GEP von LMP1-transfizierten GC-B-Zellen eine Induktion der AP-1-Faktoren BATF, BATF3, ATF, JUNB und FOS auf mRNA-Ebene (Vockerodt et al. 2008). In GC-B-Zellen scheint LMP1 also teilweise andere Zielgene als in EBV-positiven cHL zu aktivieren, auch wenn in dieser Studie der Punkt deutlich gemacht wurde, dass LMP1 GC-B-Zellen zu einem HRS-Zell-ähnlichen Phänotyp reprogrammiert (Vockerodt et al. 2008). Weitere Evidenz, dass LMP1 die Aktivität von AP-1 induzieren kann, kommen von einer Studie, in denen HEK 293-Zellen und B-Zellen mit LMP1 transfiziert wurden und diese daraufhin über die Aktivierung von JNK verstärkt AP-1 ausprägten (Kieser et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden in der immunhistochemischen Analyse Lymphome als BATF3-positiv bewertet, wenn mindestens 50% der Tumorzellen eine Färbung aufwiesen. So wurden unter diesen Parametern EBV-positive cHL-Fälle auch als BATF3 negativ beschrieben, wenn 10-20% der Tumorzellen eine Färbung für BATF3 aufzeigten. Somit könnte es durchaus sein, dass EBV-positive cHL-Fälle also nicht 100% negativ für BATF3 sind, sondern der Anteil positiver Tumorzellen nur geringer ist. LMP1 könnte also auch im cHL AP-1 bzw. BATF3 induzieren, diese Induktion ist möglicherweise aber schwächer als in EBV-negativen Fällen, in denen andere Mechanismen, wie starke JAK/STAT-Signalaktivität, zu einer stärkeren AP-1/BATF3-Ausprägung führen.

4.1.3 Essentielle Funktion von BATF3 im cHL, ALCL und PMBL

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass BATF3 essentiell für das Überleben von cHL- und ALCL-Zelllinien und einer PMBL-Zelllinie ist. Die Herunterregulation von BATF3 führt zu einer verminderten Zellproliferation und induziert Apoptose in cHL- und ALCL-Zelllinien, jedoch nicht in Kontroll-Linien, sodass eine allgemeine Toxizität der shRNAs gegen BATF3 ausgeschlossen werden kann (3.7). Erste Hinweise, dass AP-1-Faktoren sehr wichtig für das Überleben von cHL- und ALCL-Zellen sind, kam von einer Studie von Mathas und Kollegen, in der der Effekt der AP-1-Inhibition durch A-FOS gezeigt wurde. Die A-FOS-vermittelte Inhibition von AP-1 reprimiert die Proliferationskapazität von L-428-Zellen und induziert Apoptose in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 (Mathas et al. 2002). Ebenfalls ist der AP-1-Faktor ATF3 für das Überleben und die Proliferation von HRS-Zellen wichtig. So führt die siRNA (engl. *small interfering* RNA)-vermittelte Herunterregulation von ATF3 in den cHL-Linien L-540 und L-428 zu einer verminderten Proliferationsrate (Janz et al. 2006b). In den Tumorzellen des ALCLs ist ebenfalls eine starke konstitutive AP-1-Aktivität zu finden und neben JUN, JUNB und ATF3 ist auch FRA2 als ein weiterer AP-1-Faktor zu detektieren (Mathas et al. 2002, Janz et al. 2006b, Mathas et al. 2009). Starke Ausprägung von AP-1 ist im PMBL beschrieben worden, allerdings fehlten hier funktionelle Analysen zur Rolle von AP-1 (Rosenwald et al. 2003). Die Expression von BATF3, JUN und JUNB, die in dieser Arbeit auf mRNA und Proteinebene in Zelllinien und primären PMBL gezeigt wurde, spricht dafür, dass PMBL-Linien ebenfalls konstitutive AP-1-Aktivität aufweisen und es konnte erstmal die überlebenswichtige Funktion von BATF3 in der PMBL-Linie Karpas 1106P identifiziert werden (Abbildung 23). So ist in Karpas 1106P eine starke Reduktion der GFP-positiven Zellen nach BATF3-Herunterregulation zu beobachten, im Gegensatz dazu sind nur minimale Effekte in der PMBL-Linie MedB-1 nach shBATF3-Transduktion festzustellen, was dafürspricht, dass BATF3 in MedB-1 andere Zielgene reguliert.

In der kompetitiven Wachstumsanalyse ergab sich in allen getesteten cHL- und ALCL-Linien eine starke Reduktion der shBATF3-transduzierten Zellen im Vergleich zu shNT-transduzierten Zellen und Kontroll-Zelllinien. Die Analyse von apoptotischen Zellen mittels Annexin V- und PI-Färbung macht starke und auch größtenteils signifikante Unterschiede zwischen den shBATF3-transduzierten und shNT-

transduzierten cHL- und ALCL-Zelllinien mit Ausnahme der Karpas 299 deutlich (Abbildung 15). Diese ALCL-Zelllinie wies nach BATF3-Herunterregulation weder signifikante Unterschiede in der Annexin V-positiven Zell-Population auf, noch war eine verminderte Proliferationskapazität zu sehen. Die beobachtete starke Reduktion der BATF3-herunterregulierenden Zellen in der kompetitiven Wachstumsanalyse wird wahrscheinlich durch andere Mechanismen als erhöhte Apoptose und verminderte Proliferation verursacht. So sind mittlerweile über zehn verschiedene Formen des Zelltods beschrieben und neben dem klassischen Caspase-abhängigen programmierten Zelltod, der Apoptose, noch weitere Arten des Zelltods, wie z.B. Nekroptose oder Caspase-unabhängige Apoptose, identifiziert worden (Galluzzi et al. 2012). Unterschiede im Zellüberleben der Karpas 299 und SU-DHL-1 wurden in einer Studie von Turturro und seinen Kollegen beobachtet, in der die Expression von p27 in SU-DHL-1 zu apoptotischen Zellen und Zellzyklus-Arrest führte, die Effekte in Karpas 299 allerdings jedoch nicht nachzuweisen waren (Turturro et al. 2001a, Turturro et al. 2001b). Die BATF-Ausprägung wird durch Herunterregulation von BATF3 in cHL- und ALCL-Zelllinien nicht verändert, sodass BATF nicht für BATF3 im cHL und ALCL kompensieren kann. Die Kompensation durch BATF ist allerdings in einem anderen zellulären Kontext, bei der Differenzierung von cDCs, möglich (Tussiwand et al. 2012).

4.1.4 BATF3 und JUN regulieren die Expression von MYC

Die GEP von shBATF3-transduzierten L-428-Zellen ermöglichte die Identifizierung von BATF3-Zielgenen, die unter anderem für das Überleben von cHL-Linien wichtig sind. Die anschließende GSEA der BATF3-herunterregulierenden L-428-Zellen gab erste Hinweise darauf, dass *MYC* ein potentielles Zielgen von BATF3 sein könnte, was mittels Western-Blot-Analysen von shBATF3-transduzierten cHL- und ALCL-Linien bestätigt werden konnte (3.9). In der PMBL-Linie Karpas 1106P konnten ebenfalls reduzierte *MYC*-mRNA-Level detektiert werden nach BATF3-Herunterregulation. Die Regulation von *MYC* erfolgt dabei direkt über die Bindung von BATF3 und JUN an eine AP-1-Erkennungssequenz im *MYC*-Promotor. In einer früheren Studie wurde die Bindung von JUN an diese AP-1-Bindestelle im *MYC*-Promotor in der Fibroblasten-Linie NIH 3T3 beschrieben (Iavarone et al. 2003). Welche weiteren Faktoren zusammen mit BATF3 und JUN die Expression von *MYC*

in cHL- und ALCL-Zelllinien regulieren bleibt zu untersuchen. In ALCL-Zelllinien reguliert IRF4 die Expression von MYC und ist wichtig für das Zellüberleben von ALCL-Zelllinien (Weilemann et al. 2015). Im Multiplen Myelom (MM) ist MYC ebenfalls ein direktes Zielgen von IRF4 und wichtig für das Überleben der MM-Zellen (Shaffer et al. 2008). Allerdings zeigen Untersuchungen des MM, dass MYC über einen Rückkopplungsmechanismus zusätzlich die IRF4-Ausprägung regulieren kann, was beim ALCL nicht der Fall ist (Shaffer et al. 2008, Weilemann et al. 2015). In den beiden Studien von Shaffer et al. und von Weilemann et al. wurde eine andere Erkennungsstelle für IRF4 im MYC-Promotor beschrieben als die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte AP-1-Erkennungsstelle, an die BATF3 und JUN in cHL- und ALCL-Zelllinien binden. Diese AP-1-Stelle ist keine kanonische AICE-Erkennungsstelle wie sie für AP-1-IRF-Komplexe beschrieben ist (Glasmacher et al. 2012, Tussiwand et al. 2012), was darauf hindeutet, dass auch ein weiterer, unbekannter dritter Faktor mit BATF3 und JUN die Expression von MYC regulieren könnte. So konnte für BATF der Transkriptionsfaktor BACH2 als ein weiterer Interaktionspartner in TH2-Zellen identifiziert werden. Der BATF-BACH2-Komplex konkurriert dabei mit BATF-IRF4-Komplexen und erkennt hauptsächlich die AP-1-Konsensussequenz (TGA(G/C)TCA) (Kuwahara et al. 2016). In GC-B-Zellen reprimiert BACH2 die Plasmazell-Differenzierung und begünstigt den Klassenwechsel (Shaffer et al. 2002). In HRS-Zellen ist BACH2 im Vergleich zu GC-B-Zellen jedoch kaum exprimiert (Steidl et al. 2012). IRF4 konnte in den cHL-Linien HDLM-2, L-428 und U-HO1 erfolgreich herunterreguliert werden, allerdings war in keiner der cHL-Linien eine Reduktion von MYC-Protein zu detektieren. Es konnte eher eine Tendenz des leichten Anstiegs von MYC in den untersuchten cHL-Zelllinien detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde hier die ALCL-Zelllinie SR-786 verwendet, welche reduzierte MYC-Expression nach IRF4-Herunterregulation aufwies (3.13). Dies spricht dafür, dass in den cHL-Linien ein anderer Faktor im BATF3-JUN-Komplex die Ausprägung von MYC reguliert als in ALCL-Zelllinien. Da JUN ebenfalls an den MYC-Promotor in der L-428-Linie bindet, ist davon auszugehen, dass die Herunterregulation von JUN in cHL- und ALCL-Linien einen ähnlichen Phänotyp verursacht wie er in shBATF3-transduzierten Zellen zu beobachten ist. So führt die Herunterregulation von JUNB in ALK⁺-ALCL-Linien zu einer reduzierten Zellproliferation (Staber et al. 2007).

MYC ist als starkes Onkogen beschrieben und an der Pathogenese verschiedener Tumorerkrankungen beteiligt (Dang 2013). Es reguliert eine immense Anzahl an zellulären Prozessen wie Metabolismus, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung (Seitz et al. 2011, Dang 2013). Im BL und einigen DLBCL ist *MYC* aufgrund von chromosomalen Translokationen oder einer erhöhten Anzahl an Genkopien überexprimiert (Chisholm et al. 2015). So sind beim BL nahe 100% der Fälle durch eine *Ig-MYC*-Translokation gekennzeichnet (Taub et al. 1982, Battey et al. 1983). Im cHL, PMBL und ALCL führen andere Mechanismen zur Ausprägung von *MYC*, wie z.B. aberrante JAK/STAT-Signalaktivität im cHL und PMBL und IRF4-Aktivität im ALCL (Inghirami et al. 1994, Rui et al. 2010, Weilemann et al. 2015). In HRS- und PMBL-Zellen modifiziert JAK2 Histone und macht so den *MYC*-Lokus zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie (Rui et al. 2010). In dieser Arbeit konnte ein weiterer Mechanismus, die BATF3-abhängige Ausprägung von *MYC* in cHL-, ALCL- und PMBL-Zellen, identifiziert werden. Die Herunterregulation von *MYC* ist ebenfalls toxisch und führt zu einer starken Wachstumshemmung in cHL-, PMBL- und ALCL-Linien (Rui et al. 2010, Weilemann et al. 2015) (persönliche Kommunikation Markus Schneider). Gleiches konnte auch in dieser Arbeit in cHL- und ALCL-Linien reproduziert werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es einen (oder weitere) kritische Faktoren gibt. Die Re-Expression von *MYC* in BATF3-herunterregulierenden cHL- und ALCL-Zelllinien könnte zeigen, ob *MYC* den durch BATF3-Reduktion verursachten Phänotyp retten kann. In PMBL-Linien ist *MYC* nicht das einzige wichtige Zielgen von JAK2, da die Re-Expression von *MYC* die PMBL-Zellen nicht vor dem Zelltod retten kann (Rui et al. 2010).

4.1.5 Der JAK/STAT-Signalweg reguliert BATF3 in CD30⁺-Lymphomen

Mehrere Arbeiten konnten AP-1-Faktoren als Zielgene des JAK/STAT-Signalwegs in Lymphomen identifizieren (Ding et al. 2008, Lam et al. 2008, Crescenzo et al. 2015). So konnten nach Inhibition von JAK2 in cHL- und PMBL-Linien reduzierte BATF3-Proteinlevel festgestellt werden (3.15). Ebenso war es möglich mittels IL-13-Stimulation in drei getesteten cHL-Zelllinien BATF3 zu induzieren, was bestätigt, dass der JAK/STAT-Signalweg BATF3 reguliert. Die HRS-Zellen sezernieren verschiedene Zytokine, die autokrin über Zytokin-Rezeptoren den JAK/STAT-

Signalweg aktivieren können (Skinnider et al. 2001, Skinnider et al. 2002b, Scheeren et al. 2008). Eine Reihe verschiedener genetischer Läsionen sorgen außerdem für konstitutiv aktives JAK/STAT, wie inaktivierende Mutationen in den JAK-Inhibitoren *SOCS1* und *PTPN1* (Weniger et al. 2006, Gunawardana et al. 2014). Darüber hinaus konnte in dieser Studie die direkte Bindung von pSTAT3 und pSTAT6 im *BATF3*-Gen gezeigt werden. In ALCL-Linien ist hauptsächlich pSTAT3 vorzufinden (Skinnider et al. 2002a), welches an STAT-Erkennungssequenzen im *BATF3*-Gen bindet. In cHL-Zelllinien wird die Expression von *BATF3* von pSTAT3 und pSTAT6 reguliert. In den getesteten ALCL-Linien konnten keine deutlichen Effekte des JAK2-Inhibitors TG101348 auf die *BATF3*-Ausprägung beobachtet werden. So ist in keiner der untersuchten ALCL-Linien eine kontinuierliche Abnahme von pSTAT3 und *BATF3* mit steigender TG101348-Konzentration zu sehen (3.15). Da die getesteten ALCL-Linien alle ALK-positiv sind und NPM-ALK unabhängig von JAK-Molekülen STAT3 phosphorylieren kann, könnte dies die ineffiziente Wirkung des JAK2-Inhibitors TG101348 erklären (Zamo et al. 2002, Chiarle et al. 2005). Ein weiterer Grund für die ausbleibenden Effekte könnte sein, dass in ALCL-Linien hauptsächlich JAK1 ausgeprägt wird und TG101348 hauptsächlich JAK2 inhibiert und eine Inhibition von JAK1 erst bei höheren Inhibitor-Konzentrationen erreicht wird. Mit dem TG101348-Inhibitor liegt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für JAK1 bei 105 nM, während der IC_{50} für JAK2 bei 3 nM im zell-freien Assay liegt (Wernig et al. 2008). Um das Problem des ALK-Status in den ALCL-Zelllinien zu vermeiden, könnte in weiterführenden Experimenten ein STAT3-Inhibitor zur Inhibition des JAK/STAT-Signalweges getestet werden. Ebenfalls konnte mittels IL-21-Stimulation keine Induktion der *BATF3*-Level erreicht werden, obwohl eine leicht verstärkte pSTAT3-Ausprägung der ALCL-Linien nach IL-21-Behandlung zu sehen war (Abbildung 34). Die Analyse des *BATF3*-Promotorbereichs lässt außer STAT-Erkennungsstellen noch Bindestellen für NF κ B und AP-1 erkennen. Folglich könnten NF κ B- und AP-1-Faktoren zusätzlich die Ausprägung von *BATF3* regulieren. ChIP-Experimente mit NF κ B- und AP-1-Faktoren könnten aufdecken, ob diese Faktoren an bestimmte Erkennungssequenzen im Promotorbereich von *BATF3* binden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die JAK/STAT-abhängige konstitutive Ausprägung von *BATF3* in CD30⁺-Lymphomen gezeigt werden. *BATF3* ist essentiell

für das Überleben und die Proliferation von cHL- und ALCL-Zellen und ein Teil seiner onkogenen Wirkung wird über die Regulation von MYC vermittelt (Abbildung 42).

4.1.6 Zusammenhang zwischen CD30, MYC und BATFs in der Lymphompathogenese

Die Frage nach der funktionellen Relevanz zwischen der Ausprägung von CD30 und BATF3 bleibt offen. Da die physiologische Vorläuferzelle des cHLs noch nicht eindeutig identifiziert worden ist und diskutiert wird, ob CD30⁺-GC-B-Zellen den Ursprung der HRS-Zellen darstellen, wäre es vom großen Interesse die Funktion von BATF3 in diesen normalen B-Lymphozyten zu charakterisieren. Ebenfalls sind das PMBL und eine kleine Fraktion der DLBCL durch CD30- und MYC-Expression gekennzeichnet (Rui et al. 2010, Hu et al. 2013). Immunhistochemische Färbungen von CD30⁺-B-Lymphozyten zeigen ebenfalls MYC-Ausprägung (Cattoretti 2013). CD30- und MYC-positive B-Zellen sind innerhalb und außerhalb des GC zu finden (Cattoretti 2013). Zusätzlich prägen die extrafollikulären CD30⁺ MYC⁺-GC-B-Zellen PRDM1 und IRF4 aus und zeigen eine starke NFκB-Signatur (persönliche Kommunikation Dr. Marc Weniger). Für IRF4 ist bekannt, dass es die Expression von PRDM1 reguliert, um die B-Zelle beim Verlassen des GC auf die Differenzierung zur Plasmazelle vorbereiten zu können (Basso et al. 2015). GEP von MYC-positiven GC-B-Zellen haben eine starke Ausprägung von BATF, IRF4 und CCND2 im Vergleich zu MYC-negativen GC-B-Zellen identifiziert (Dominguez-Sola et al. 2012). Darüber hinaus ist MYC im GC für die Rezirkulation der positiv-selektionierten GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone verantwortlich (Calado et al. 2012, Dominguez-Sola et al. 2012). Für BATF ist bekannt, dass es zusammen mit JUN und IRF4 die Expression von AID reguliert und für die CSR wichtig ist (Betz et al. 2010, Ise et al. 2011). Dass BATF3 und BATF beide in den CD30⁺ MYC⁺-B-Lymphozyten zu finden sind, spricht dafür, dass diese beiden Faktoren in der CD30⁺ MYC⁺-B-Zell-Population distinkte Funktionen ausüben. Die Funktion von BATF3 in den CD30⁺ MYC⁺ IRF4⁺-B-Lymphozyten aufzudecken, könnte helfen die Pathogenese von CD30⁺-Lymphomen besser zu verstehen und welche Bedeutung und welcher Zusammenhang zwischen CD30-, BATF3- und MYC-Ausprägung besteht. Darüber hinaus ist CD30 nicht nur ein wichtiger Marker bei der Diagnose des cHLs, sondern auch ein therapeutisches Ziel geworden. Ein anti-CD30 Antikörper gekoppelt mit einem Mikrotubuli-Inhibitor

(Brentuximab-Vedotin) wird zur Behandlung von CD30-positiven Lymphomen eingesetzt und hat bisher vielversprechende Resultate erzielt (Younes et al. 2010, Pro et al. 2012, Duvic et al. 2015). Die Funktion von CD30 besser zu verstehen, könnte somit auch helfen die Antikörpertherapie weiter zu verbessern.

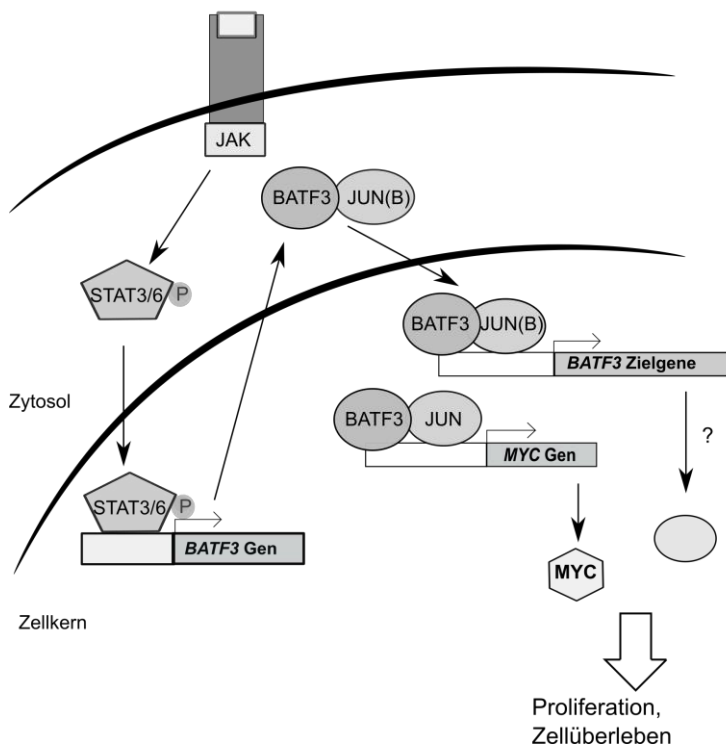


Abbildung 42: Onkogene Wirkung und Regulation von BATF3 in CD30⁺-Lymphomen. Konstitutiv aktives JAK/STAT führt zur starken Ausprägung von BATF3 im cHL, ALCL und PMBL. BATF3 formt Dimere mit JUN-Proteinen und reguliert unter anderem die Expression von MYC, was entscheidend für das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen ist (Lollies et al. 2017).

4.2 Genetische Analyse von Kombinationslymphomen

4.2.1 Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von Kombinationslymphomen mittels IgV-Gen-Analysen

Die genetische Charakterisierung von Kombinationslymphomen ermöglicht es Einblicke in die Mehrschritt-Pathogenese dieser Lymphome zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Kombinationslymphome bestehend aus cHL und NHL auf ihre klonale Verwandtschaft und auf genetische Läsionen analysiert. Bei der Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von Kombinationslymphomen mittels IgV-Gen-PCR wurde für alle analysierten Sequenzen geprüft, ob es sich um eine produktive Sequenz handelt, die sich im Leseraster befindet und bei der die CDR 3-Region kein Stopp-Codon enthält oder ein VH-Pseudogen benutzt wurde. Mutationsfrequenzen wurden ermittelt, um Aussagen über das Verhältnis von Klonen

machen zu können und den Tumorzellen ihren physiologischen Vorläuferzellen zuordnen zu können.

In zwei von drei Kombinationslymphomen konnte eine klonale Verwandtschaft durch gleiche IgV-Genumlagerungen identifiziert werden (3.16.1). Das erste Kombinationslymphom bestehend aus CLL und cHL zeigte unmutiertes VH1-69, V κ 1-5 und ein unproduktives V κ 2-30 in allen analysierten Lymphomzellen. Zu diesem Zeitpunkt kann noch keine eindeutige Aussage über das Verwandtschaftsverhältnis von CLL und cHL gemacht werden, da das mutierte VH4-34 nur in einer von zwei HRS-Zell-Proben detektiert wurde und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass es von einer Post-GC-B-Zelle stammt. Gegen die klonale Verwandtschaft spricht einerseits die Tatsache, dass die sortierten HRS-Zellen nur eine Reinheit von rund 50% aufweisen, beide Tumoranteile aus dem Knochenmark des Patienten stammen und die CLL-Zellen hoch angereichert sind. Dies würde implizieren, dass die unmutierten IgV-Gene von dem CLL-Klon stammen. Ein weiterer Grund der dafür spricht, dass in den sortierten HRS-Zellen kontaminierende CLL-Zellen zu finden sind, ist die Abstammung der HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen, die eine SHM durchlaufen haben und meistens somatisch mutierte IgV-Gene besitzen (Küppers et al. 1993, Kanzler et al. 1996a, Marafioti et al. 1999). Allerdings gibt es auch cHL-Fälle, die unmutierte IgV-Gene besitzen (Müschen et al. 2001). Zur Identifizierung des HRS-Zell-Klons und zur eindeutigen Bestimmung der klonalen Verwandtschaft sollen erstens einzelne HRS-Zellen für eine IgV-Gen-PCR mikrodisektiert werden und zweitens die VH4-34-Abdeckung aus der Exom-Sequenzierung untersucht werden. Eine hohe Abdeckung von VH4-34 würde für die Genumlagerung des HRS-Zell-Klons sprechen und gegen eine klonale Verwandtschaft von cHL und CLL. Für die HRS-Zellen konnten die gleichen Ig κ -Genumlagerungen wie in den CLL-Zellen detektiert werden. Falls zwischen CLL- und HRS-Zellen keine klonale Verwandtschaft besteht, konnte somit keine IgV-Genumlagerung der κ -Kette gefunden werden. Entweder konnte die κ -Genumlagerung, z.B. aufgrund von mutierten Nukleotiden in den *Primer*-Bindestellen, nicht amplifiziert werden oder die Tumorzellen besitzen eine λ -Genumlagerung. So findet vor der VJ-Rekombination auf dem λ -Lokus zuerst die VJ-Rekombination auf dem κ -Lokus statt. Ig λ -positive Zellen haben ihre umgeordneten Ig κ -Allele inaktiviert, um weitere Rekombinationsprozesse zu verhindern. War die

V κ J κ -Rekombination nicht erfolgreich, wird der κ -Lokus stillgelegt. Die Inaktivierung findet über einen RAG-vermittelten Prozess statt, der über eine 3' stromabwärts von C κ gelegene Sequenz, dem *kappa*-inaktivierendem Element (engl. *kappa-deleting element*, KDE), vermittelt wird (Siminovitch et al. 1985, Küppers et al. 1996). Hierbei kann das KDE in eine intronische RSS oder in eine RSS zwischen V- und J-Gen integrieren (Perfetti et al. 2004). In diesem Fall kann eine V κ J κ -Umlagerung nachgewiesen werden, diese kann aber wegen des Fehlens der Ig κ -*Enhancer* nicht mutiert werden. Die Tumorzellen der CLL stammen vermutlich von GC-unerfahrenen B-Zellen ab und gehören zur Gruppe der unmutierten CLL, die einen aggressiveren klinischen Verlauf zeigen (Hamblin et al. 1999). CLL-Zellen besitzen in etwa 20% der Fälle stereotype BCRs und zeigen vermehrtes Auftreten von VH1-69, VH4-34 oder V κ 2-30 (Stamatopoulos et al. 2007). Vor allem unmutierte BCR von CLL-Klonen besitzen Poly- und Autoreaktivität gegenüber cytoplasmatischen Antigenen (Hervé et al. 2005). Inwiefern das unmutierte VH1-69 in der Pathogenese der CLL eine Rolle spielt, ist allerdings unklar.

Eine Kombination aus klonal verwandtem cHL und SMZL ergab die IgV-Gen-Analyse des zweiten Kombinationslymphoms. Die Tumorzellen beider Lymphome zeigen identisch mutierte VH3-23- und V κ 1-8-Genumlagerungen. Die analysierten Sequenzen der IgV-Gene sind alle potentiell produktiv, da auch keine biallelisch umgeordneten VH- und V κ -Gene nachgewiesen werden können. HRS- und SMZL-Zellen sind auf eine gemeinsame (Post)-GC-Ursprungszelle zurückzuführen, da der Tumorklon zwar keine intraklonale Diversität, aber somatisch mutierte IgV-Gene aufweist und demnach von einer B-Zelle stammt, die bereits die GC-Reaktion – den Prozess der SHM und der Antigen-Selektion - durchlaufen hat. Kombinationen von SMZL und cHL sind äußerst selten unter den Kombinationslymphomen und es gibt nur wenige Studien, die solche Kombinationen beschrieben haben (Rosenquist et al. 2004a, Harada et al. 2008, Zeidan et al. 2013). Rosenquist und Kollegen beschrieben das Auftreten von klonal verwandten SMZL und cHL mit identischen IgV-Umlagerungen in einem Patienten, bei dem das cHL erst 15 Jahre nach dem SMZL auftrat. Die Beschreibung dieses Falles als Kombinationslymphom ist jedoch zu hinterfragen, da Kombinationslymphome per Definition gleichzeitig und in der Regel auch im selben Organ auftreten (Küppers et al. 2014). Auffällig waren in der Studie von Rosenquist und Kollegen die unmutierten IgV-Gene in beiden

Lymphomen, da das cHL von GC-B-Zellen stammt und daher durch den Prozess der SHM somatisch mutierte IgV-Gene aufweisen sollte (Küppers et al. 1994, Rosenquist et al. 2004b). Allerdings wird das Vorhandensein von sogenannten Gründer-GC-B-Zellen (engl. *germinal center founder cells*) diskutiert, in denen die SHM noch nicht stattgefunden hat und somit der HRS-Zellklon in diesem Fall von Gründer-GC-B-Zellen abstammen könnte (Lebecque et al. 1997). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kombinationslymphom aus SMZL und cHL hat seinen Ursprung in Antigen-erfahrenen GC-B-Zellen und besitzt leicht mutierte IgV-Gene mit Mutationsfrequenzen von 2,8% für VH3-23 und 2,3% für Vκ1-8. Somit liegt die Mutationsfrequenz unter der von normalen GC-B-Zellen, was für einen Ursprung dieser Zellen von GC-B-Zellen spricht, die schnell das GC verlassen haben und positiv selektioniert wurden.

Das dritte Kombinationslymphom besteht aus einem cHL und MZL und zeigte nach IgV-Gen-Analyse ein mutiertes VH3-23 und ein unmutiertes Vκ1-16. Das mutierte VH3-23, welches in etwa der Hälfte der mikrodisezierten Einzelzellen in beiden Lymphomen gefunden werden konnte, spricht für die klonale Verwandtschaft von cHL und MZL. Ursprünglich wurde angenommen, dass das MZL von naiven Antigen-unerfahrenen B-Zellen abstammt, allerdings haben Studien diese Annahme widerlegt und gezeigt, dass etwa 40% der MZL somatisch mutierte IgV-Gene aufweisen (Perez-Galan et al. 2011). Das hier analysierte Kombinationslymphom ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die Tumorzellen des MZL auch von Antigen-erfahrenen GC-B-Zellen abstammen können. Innerhalb der beiden Lymphome ist keine intraklonale Diversität der VH3-23-Genumlagerung zu detektieren, was dafürspricht, dass der Tumorklon des cHLs und des MZLs von einer B-Zelle abstammt, die bereits eine GC-Reaktion durchlaufen hat und das während der malignen Proliferation keine weitere Diversifizierung der IgV-Gene mehr stattgefunden hat. In einer Studie von Dr. Stefanie Schneider und ihren Kollegen wurde ebenfalls ein Kombinationslymphom bestehend aus MZL und cHL mit gemeinsamem GC-B-Zell-Ursprung identifiziert, welches ebenfalls ein identisches SHM-Muster zeigte und keine intraklonale Diversität aufwies (Schneider et al. 2014). Hingegen wurde in einer Studie von Tinguely und seinen Kollegen ein Kombinationslymphom aus MZL und cHL beschrieben, in dem die MZL-Zellen unmutierte IgV-Gene und die HRS-Zellen leicht mutierte IgV-Gene besaßen (Tinguely et al. 2003). Hier ist anzunehmen, dass die

Lymphome sich bereits im Stadium der Prä-GC-B-Zelle auftrennten. Das im Rahmen dieser Arbeit analysierte Kombinationslymphom prägt laut pathologischen Befund CCND1 in den Tumorzellen des MZL aus, hingegen sind die HRS-Zellen des cHLs CCND1 negativ in der IHC. Die Überexpression von CCND1 im MZL ist Folge einer *CCND1*-Translokation unter die Kontrolle des IgH-*Enhancers* und stellt ein frühes pathogenetisches Ereignis während der VDJ-Rekombination im Stadium der Prä-B-Zell-Entwicklung dar (Welzel et al. 2001). Da in HRS-Zellen die Ausprägung der Ig-Gene durch epigenetische Mechanismen supprimiert wird und die an der Ig-Transkription beteiligten Transkriptionsfaktoren OCT2 und BOB1 nicht mehr exprimiert werden (Stein et al. 2001, Ushmorov et al. 2004), wäre die Detektion von CCND1-Protein auch bei vorhandener IgH-Translokation eher unwahrscheinlich. Studien von Schmitz und seinen Kollegen zeigen ebenfalls ein Kombinationslymphom aus MZL und cHL, dessen Tumorklone beide die *CCND1*-Translokation besitzen, allerdings nur für die MZL-Zellen auch CCND1 auf Proteinebene zu detektieren ist (Schmitz et al. 2005). Interessanterweise prägen HRS-Zellen oftmals CCNE1 aus, welches die Funktion von CCND1 im Maus-Modell ersetzen kann und es wird diskutiert, ob nicht auch beim cHL die Funktion von CCND1 durch CCNE1 ersetzt worden ist (Geng et al. 2001, Schmitz et al. 2005). Die unmutierte V κ 1-16 Genumlagerung in den HRS- und MZL-Zellen spricht dafür, dass bei dem Tumorklon eine Genumordnung auf dem λ -Lokus stattgefunden hat.

Beim Fehlen von intraklonaler Diversität in klonal verwandten Kombinationslymphomen gilt zu beachten, ob bei der Diagnose eine Lymphom-Transformation ausgeschlossen werden kann, was einer Transformation von einem indolenten Lymphom (z.B. CLL, FL) in ein aggressives Lymphom (z.B. MZL, DLBCL, BL) entspricht (Swerdlow et al. 2008, Montoto et al. 2011). Die Transformation einer CLL in ein DLBCL wird dabei als Richter Transformation bezeichnet und es sind sogar Fälle von Richter Transformationen der CLL in ein HL beschrieben worden (Bockorny et al. 2012).

Die genauere Betrachtung der PCR-Effizienzen in den drei untersuchten Kombinationslymphomen veranschaulicht, dass die Effizienz der IgV-Gen-PCR der HRS-Zellen immer schlechter ausfiel als die der NHL-Zellen. So liegt die PCR-Effizienz der HRS-Zellen bei 22-50%, während die der NHL-Zellen bei 42-100% liegt. Obwohl die IgV-Gen-PCR seit vielen Jahren etabliert ist und in einigen Studien

angewendet wurde (Küppers et al. 1993, Bräuninger et al. 1999, Seifert et al. 2009) kann die schlechtere PCR-Effizienz der HRS-Zellen durch die Methode der Mikrodisektion zu erklären sein. Die Zellkerne der HRS-Zellen sind im Vergleich zu denen der NHL-Zellen relativ groß und verteilen sich über mehrere Gewebeschnitte. So wird nur ein Teil des Kerns bei der Lasermikrodisektion ausgeschnitten und somit steht weniger DNA für die anschließende Amplifizierung durch die Polymerase zur Verfügung.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die IgV-Gene der Lymphome erfolgreich amplifiziert und ermittelt werden konnten und zwei der drei untersuchten Kombinationslymphome eine klonale Verwandtschaft zeigen. Weitere Analysen werden die klonale Verwandtschaft des ersten untersuchten Kombinationslymphoms klären. Die anschließende genomweite Untersuchung von gemeinsamen und separaten genetischen Läsionen in den beiden Lymphomen eines Kombinationslymphoms wird weitere Einblicke in die Lymphom-Pathogenese erlauben und möglicherweise helfen neue, transformierende Ereignisse der Lymphome zu identifizieren und besser zu verstehen.

4.2.2 Vorläufige Analyse genetischer Läsionen in Kombinationslymphomen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Grundlage für die weitere umfassende Charakterisierung von genetischen Läsionen in Kombinationslymphomen gelegt werden. Die Exom-Sequenzierung der drei Kombinationslymphome konnte erfolgreich durchgeführt werden, was anhand der guten mittleren Abdeckung sichtbar wird (Tabelle 20). Eine Ausnahme bildet das MZL im dritten Kombinationslymphom. Hier ist die Abdeckung deutlich geringer im Vergleich zu den anderen mittels WGA-behandelten Proben (26% vs. 60-80%). Die Ursache für die relativ schlechte mittlere Abdeckung dieser Probe ist unklar. Möglicherweise könnte eine schlechte DNA-Qualität ein Grund für die geringe Abdeckung sein. Auffällig ist außerdem bei der Betrachtung der Anzahl der genetischen Läsionen zwischen den Kombinationslymphomen, dass die Exom-Sequenzierungen der mit WGA-analysierten Kombinationslymphome eine höhere Anzahl an SNVs aufweisen als die sequenzierten Proben des ersten Kombinationslymphoms ohne WGA. Um genauere Aussagen über den Einfluss der WGA machen zu können, müssten mehr Fälle und

idealerweise auch identische Fälle mit und ohne WGA analysiert und verglichen werden. Dies wäre allerdings sehr kostenaufwendig. Ein bekanntes Problem der WGA ist die bevorzugte Amplifizierung bestimmter Bereiche im Genom (Zong et al. 2012). So können Genzahlvarianten von den mit WGA-sequenzierten Proben bisher nicht analysiert werden. Zur Kompensation von Ungleichheiten in den WGAs wurden technische Replikate der WGA von jeder Probe bzw. jedem Lymphom angefertigt und nur Varianten ausgewählt, die in mindestens zwei technischen Replikaten zu finden waren. Zusätzlich wurde bei der WGA eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet, um das Problem von falsch-positiven Varianten zu minimieren (de Bourcy et al. 2014) (persönliche Kommunikation Dr. Markus Schneider). Um die in der Exom-Sequenzierung identifizierten SNVs in den verschiedenen Lymphomen validieren zu können, sollen nun mikrodisezierte Tumor- und Nicht-Tumorzellen mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Danach können funktionelle Analysen mit potentiellen Onko- und Tumorsuppressorgenen durchgeführt werden. Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode ist es möglich potentielle Onkogene in verschiedenen Lymphom-Zelllinien komplett auszuschalten (Cong et al. 2013, Shalem et al. 2014). Eine vorläufige Auswahl von Varianten interessanter Kandidatengene, die in einer Multiplex-PCR validiert werden sollen, wurde bereits zusammengestellt (3.16.3). Mutationen in *NOTCH2* wurden z.B. im zweiten und dritten Kombinationslymphom in den Tumorzellen des MZL und des SMZL identifiziert. Die im SMZL identifizierte *NOTCH2*-Mutation (Arg2400Ter) ist als rekurrente Mutation im SMZL beschrieben, befindet sich in der PEST-Domäne und führt zu einer höheren enzymatischen Aktivität von NOTCH2 (Kiel et al. 2012). *NOTCH2*-Mutationen sind ebenfalls für das MZL identifiziert worden, allerdings ist die gefundene Variante des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MZL noch nicht in der Literatur beschrieben worden (Bea et al. 2013). Hierbei könnte es sich also um eine neu identifizierte *NOTCH2*-Mutation im MZL handeln. Bei der weiteren Analyse des ersten Kombinationslymphoms gilt zu beachten, dass die DNA der Lymphomzellen zwar nicht mit einer WGA vervielfältigt wurde, aber die Reinheit der sortierten HRS-Zell-Population nur bei rund 50% liegt. Das bedeutet, dass kontaminierende CLL-Zellen bei der Validierung der genetischen Läsionen ein Problem darstellen können. Um dieses Problem zu vermeiden, sollen für zukünftige Validierungsstudien des ersten Kombinationslymphoms HRS-Zellen

aus Lymphknotenbiopsaten mikrodisektiert werden, die mit Hilfe einer CD30-Färbung identifiziert werden und somit kontaminierende CLL-Zellen weitgehend ausgeschlossen werden können. Für die Fortführung dieses Projektes sind bereits in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann weitere Kombinationslymphome für genetische Analysen gesammelt worden, welche auf ihre klonale Verwandtschaft und auf genetische Läsionen untersucht werden können. Die Validierung interessanter Kandidatengene und funktionelle Charakterisierung von genetischen Läsionen in diesen Kombinationslymphomen wird dabei helfen frühe gemeinsame pathogenetische Läsionen wie auch später auftretende separate transformierende Ereignisse zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Eine veränderte Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist Kennzeichen vieler maligner Lymphome, trotzdem sind die Schlüsseldefekte dieser veränderten Aktivität in der Lymphom-Pathogenese bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Die Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (engl. *classical Hodgkin Lymphoma*, cHL), des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms (PMBL) und des anaplastisch großzelligem Lymphoms (ALCL) entstehen zwar aus unterschiedlichen Vorläuferzellen (prä-apoptotischen B-Zellen, thymischen B-Zellen und T-Zellen), sind jedoch durch Gemeinsamkeiten wie deregulierte JAK/STAT-Aktivität und Ausprägung von CD30 und AP-1 (engl. *Activator protein-1*)-Faktoren gekennzeichnet. AP-1-Faktoren regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse, allerdings sind sie auch in der Pathogenese von Lymphomen beteiligt. Im PMBL, cHL und ALCL sind hohe Transkriptionslevel von dem AP-1-Faktor BATF3 zu detektieren und die bis dahin unbekannte Funktion von BATF3 in der Lymphompathogenese sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. BATF3-Protein wurde in den Tumorzellen des cHLs, PMBLs und ALCLs sowie in den Tumorzellen des CD30⁺ diffus großzelligem B-Zell-Lymphoms detektiert, das heißt BATF3 ist bevorzugt in CD30⁺-Lymphomen exprimiert. Als Interaktionspartner von BATF3 sind die AP-1-Faktoren JUN und JUNB in cHL- und ALCL-Zelllinien charakterisiert worden. Die Herunterregulation von BATF3 ist toxisch für CD30⁺-Lymphom-Zelllinien und führt zur erhöhten Apoptose und verminderten Zellproliferation in cHL- und ALCL-Zelllinien. Das Onkogen MYC konnte unter den Zielgenen von BATF3 identifiziert werden. So führt die Herunterregulation von BATF3 auch zu einer Reduktion von MYC in cHL-, ALCL- und einer von zwei PMBL-Zelllinien. MYC-Ausprägung wird durch die Bindung von BATF3 und JUN an den MYC-Promotor reguliert. Direkt an den *BATF3*-Promotor binden phosphorylierte STAT-Faktoren in cHL- und ALCL-Zelllinien und so führt konstitutive JAK/STAT-Signalaktivität zur Expression von BATF3 in cHL-, ALCL- und vermutlich auch PMBL-Tumorzellen. Folglich konnte im Rahmen dieser Arbeit BATF3 als essentieller Faktor für das Überleben von cHL- und ALCL-Zelllinien charakterisiert werden und die onkogene Achse der STAT-vermittelten Induktion von BATF3 identifiziert werden, welche die Ausprägung von MYC reguliert.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurden Kombinationslymphome bestehend aus einem cHL und Non-Hodgkin-Lymphom auf genetische Läsionen untersucht, um Einblicke in die Mehrschritt-Pathogenese von Lymphomen zu erhalten. Analysen der variablen (V) Region von Immunglobulin (Ig)-Genen konnten eine klonale Verwandtschaft durch gleiche IgV-Genumlagerungen in zwei von drei untersuchten Kombinationslymphomen nachweisen. Die Exom-Sequenzierung der drei Kombinationslymphome konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Validierung und funktionelle Charakterisierung der gefundenen genetischen Läsionen wird helfen die Krankheitsentstehung von Lymphomen besser zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Aldinucci, D., D. Lorenzon, L. Cattaruzza, A. Pinto, A. Gloghini, A. Carbone, A. Colombatti (2008). Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. Int J Cancer **122**(4): 769-776.
- Ammerpohl, O., A. Haake, S. Pellissery, M. Giefing, J. Richter, B. Balint, M. Kulis, J. Le, M. Bibikova, H. G. Drexler, et al. (2012). Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. Leukemia **26**(1): 185-188.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, M. Karin (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell **49**(6): 729-739.
- Ansell, S. M., A. M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E. C. Scott, M. Gutierrez, S. J. Schuster, M. M. Millenson, D. Cattry, G. J. Freeman, et al. (2015). PD-1 blockade with Nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med **372**(4): 311-319.
- Arcaini, L., D. Rossi, M. Paulli (2016). Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. Blood **127**(17): 2072-2081.
- Aronheim, A., E. Zandi, H. Hennemann, S. J. Elledge, M. Karin (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. Mol Cell Biol **17**(6): 3094-3102.
- Arthur, J. S. C., S. C. Ley (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nature reviews. Immunology **13**(9): 679.
- Atsaves, V., L. Lekakis, E. Drakos, V. Leventaki, M. Ghaderi, G. E. Baltatzis, D. Chioureas, D. Jones, M. Feretzaki, C. Liakou, et al. (2014). The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. Br J Haematol **167**(4): 514-523.
- Atsaves, V., R. Zhang, D. Ruder, Y. Pan, V. Leventaki, G. Z. Rassidakis, F. X. Claret (2015). Constitutive control of AKT1 gene expression by JUNB/CJUN in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma: a novel crosstalk mechanism. Leukemia **29**(11): 2162-2172.
- Barry, T. S., E. S. Jaffe, L. Sorbara, M. Raffeld, S. Pittaluga (2003). Peripheral T-cell lymphomas expressing CD30 and CD15. Am J Surg Pathol **27**(12): 1513-1522.
- Barth, T. F., F. Leithauser, S. Joos, M. Bentz, P. Möller (2002). Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? Lancet Oncol **3**(4): 229-234.
- Basso, K., R. Dalla-Favera (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. Advances in immunology **105**: 193-210.
- Basso, K., R. Dalla-Favera (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nat Rev Immunol **15**(3): 172-184.
- Batthey, J., C. Moulding, R. Taub, W. Murphy, T. Stewart, H. Potter, G. Lenoir, P. Leder (1983). The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. Cell **34**(3): 779-787.
- Baumforth, K. R., A. Birgersdotter, G. M. Reynolds, W. Wei, G. Kapatai, J. R. Flavell, E. Kalk, K. Piper, S. Lee, L. Machado, et al. (2008). Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. Am J Pathol **173**(1): 195-204.

- Baus, D., E. Pfitzner (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. Int J Cancer **118**(6): 1404-1413.
- Bea, S., R. Valdes-Mas, A. Navarro, I. Salaverria, D. Martin-Garcia, P. Jares, E. Gine, M. Pinyol, C. Royo, F. Nadeu, et al. (2013). Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A **110**(45): 18250-18255.
- Berek, C., A. Berger, M. Apel (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. Cell **67**(6): 1121-1129.
- Berridge, M. V., A. S. Tan (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of biochemistry and biophysics **303**(2): 474-482.
- Betz, B. C., K. L. Jordan-Williams, C. Wang, S. G. Kang, J. Liao, M. R. Logan, C. H. Kim, E. J. Taparowsky (2010). Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. J Exp Med **207**(5): 933-942.
- Blonska, M., Y. Zhu, H. H. Chuang, M. J. You, K. Kunkalla, F. Vega, X. Lin (2015). Jun-regulated genes promote interaction of diffuse large B-cell lymphoma with the microenvironment. Blood **125**(6): 981-991.
- Bockorny, B., I. Codreanu, C. A. Dasanu (2012). Hodgkin lymphoma as Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective analysis of world literature. Br J Haematol **156**(1): 50-66.
- Boddicker, R. L., N. S. Kip, X. Xing, Y. Zeng, Z. Z. Yang, J. H. Lee, L. L. Almada, S. F. Elswa, R. A. Knudson, M. E. Law, et al. (2015). The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-kappaB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. Blood **125**(20): 3118-3127.
- Bohle, V., C. Döring, M. L. Hansmann, R. Küppers (2013). Role of early B-cell factor 1 (EBF1) in Hodgkin lymphoma. Leukemia **27**(3): 671-679.
- Boudova, L., E. Torlakovic, J. Delabie, P. Reimer, B. Pfister, S. Wiedenmann, V. Diehl, H. K. Müller-Hermelink, T. Rudiger (2003). Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. Blood **102**(10): 3753-3758.
- Bräuninger, A., M. L. Hansmann, J. G. Strickler, R. Dummer, G. Burg, K. Rajewsky, R. Küppers (1999). Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med **340**(16): 1239-1247.
- Calado, D. P., Y. Sasaki, S. A. Godinho, A. Pellerin, K. Kochert, B. P. Sleckman, I. M. de Alboran, M. Janz, S. Rodig, K. Rajewsky (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. Nat Immunol **13**(11): 1092-1100.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, R. Longnecker (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. Immunity **9**(3): 405-411.
- Carbone, A., A. Gloghini, G. Gaidano, S. Franceschi, D. Capello, H. G. Drexler, B. Falini, R. Dalla-Favera (1998). Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. Blood **92**(7): 2220-2228.
- Carbone, A., A. Gloghini, H. J. Gruss, A. Pinto (1995). CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. Am J Pathol **147**(4): 912-922.

- Cattoretti, G. (2013). MYC expression and distribution in normal mature lymphoid cells. J Pathol **229**(3): 430-440.
- Cattoretti, G., C. Angelin-Duclos, R. Shaknovich, H. Zhou, D. Wang, B. Alobeid (2005). PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. J Pathol **206**: 76-86.
- Chiarle, R., W. J. Simmons, H. Cai, G. Dhall, A. Zamo, R. Raz, J. G. Karras, D. E. Levy, G. Inghirami (2005). Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. Nat Med **11**(6): 623-629.
- Chisholm, K. M., C. D. Bangs, C. E. Bacchi, H. Molina-Kirsch, A. Cherry, Y. Natkunam (2015). Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. Am J Surg Pathol **39**(3): 294-303.
- Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkhurst, M. Muratet, et al. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell **151**(2): 289-303.
- Compagno, M., W. K. Lim, A. Grunn, S. V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, et al. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. Nature **459**: 717-721.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science **339**(6121): 819-823.
- Corbett, S. J., I. M. Tomlinson, E. L. Sonnhhammer, D. Buck, G. Winter (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. J Mol Biol **270**(4): 587-597.
- Crescenzo, R., F. Abate, E. Lasorsa, F. Tabbo, M. Gaudiano, N. Chiesa, F. Di Giacomo, E. Spaccarotella, L. Barbarossa, E. Ercole, et al. (2015). Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. Cancer Cell **27**(4): 516-532.
- Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood **94**(6): 1840-1847.
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. Cold Spring Harb Perspect Med **3**(8).
- Davis, H. E., M. Rosinski, J. R. Morgan, M. L. Yarmush (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. Biophys J **86**(2): 1234-1242.
- de Bourcy, C. F., I. De Vlaminc, J. N. Kanbar, J. Wang, C. Gawad, S. R. Quake (2014). A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. PLoS One **9**(8): e105585.
- De Silva, N. S., U. Klein (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. Nat Rev Immunol **15**(3): 137-148.
- Dent, A. L., A. L. Shaffer, X. Yu, D. Allman, L. M. Staudt (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. Science **276**(5312): 589-592.
- Dien Bard, J., P. Gelebart, M. Anand, Z. Zak, S. A. Hegazy, H. M. Amin, R. Lai (2009). IL-21 contributes to JAK3/STAT3 activation and promotes cell growth in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Am J Pathol **175**(2): 825-834.

- Ding, B. B., J. J. Yu, R. Y. Yu, L. M. Mendez, R. Shaknovich, Y. Zhang, G. Cattoretti, B. H. Ye (2008). Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. Blood **111**(3): 1515-1523.
- Doerr, J. R., C. S. Malone, F. M. Fike, M. S. Gordon, S. V. Soghomonian, R. K. Thomas, Q. Tao, P. G. Murray, V. Diehl, M. A. Teitell, et al. (2005). Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. J Mol Biol **350**(4): 631-640.
- Döhner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, P. Lichter (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med **343**(26): 1910-1916.
- Dominguez-Sola, D., G. D. Victora, C. Y. Ying, R. T. Phan, M. Saito, M. C. Nussenzweig, R. Dalla-Favera (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. Nat Immunol **13**(11): 1083-1091.
- Drakos, E., V. Leventaki, E. J. Schlette, D. Jones, P. Lin, L. J. Medeiros, G. Z. Rassidakis (2007). c-Jun expression and activation are restricted to CD30+ lymphoproliferative disorders. Am J Surg Pathol **31**(3): 447-453.
- Duvic, M., M. T. Tetzlaff, P. Gangar, A. L. Clos, D. Sui, R. Talpur (2015). Results of a Phase II Trial of Brentuximab Vedotin for CD30+ Cutaneous T-Cell Lymphoma and Lymphomatoid Papulosis. J Clin Oncol **33**(32): 3759-3765.
- Echlin, D. R., H. J. Tae, N. Mitin, E. J. Taparowsky (2000). B-ATF functions as a negative regulator of AP-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by Ras and Fos. Oncogene **19**(14): 1752-1763.
- Eckerle, S., V. Brune, C. Doring, E. Tiacchi, V. Bohle, C. Sundstrom, R. Kodet, M. Paulli, B. Falini, W. Klapper, et al. (2009). Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. Leukemia **23**(11): 2129-2138.
- Eferl, R., E. F. Wagner (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer **3**(11): 859-868.
- Ek, S., M. Dictor, M. Jerkeman, K. Jirstrom, C. A. Borrebaeck (2008). Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood **111**(2): 800-805.
- Engert, A. (2015). Hodgkin's lymphoma: who needs consolidation treatment? Lancet **385**(9980): 1810-1812.
- Engert, A., S. J. Horning (2011). Hodgkin lymphoma. Heidelberg, Springer.
- Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl, P. Green (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res **8**(3): 175-185.
- Falini, B., S. Pileri, G. Pizzolo, H. Durkop, L. Flenghi, F. Stirpe, M. F. Martelli, H. Stein (1995). CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. Blood **85**(1): 1-14.
- Falzetti, D., B. Crescenzi, C. Matteuci, B. Falini, M. F. Martelli, H. Van Den Berghe, C. Mecucci (1999). Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. Haematologica **84**(4): 298-305.
- Feuillard, J., D. Taylor, M. Casamayor-Palleja, G. D. Johnson, I. C. MacLennan (1995). Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. Int Immunol **7**(1): 121-130.

- Figuerola, C., S. Tarras, J. Taylor, A. B. Vojtek (2003). Akt2 negatively regulates assembly of the POSH-MLK-JNK signaling complex. *J Biol Chem* **278**(48): 47922-47927.
- Fischer, M., M. Juremalm, N. Olsson, C. Backlin, C. Sundstrom, K. Nilsson, G. Enblad, G. Nilsson (2003). Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer* **107**(2): 197-201.
- Gaidano, G., P. Ballerini, J. Z. Gong, G. Inghirami, A. Neri, E. W. Newcomb, I. T. Magrath, D. M. Knowles, R. Dalla-Favera (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5413-5417.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120.
- Gascoyne, R. D., P. Aoun, D. Wu, M. Chhanabhai, B. F. Skinnider, T. C. Greiner, S. W. Morris, J. M. Connors, J. M. Vose, D. S. Viswanatha, et al. (1999). Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **93**(11): 3913-3921.
- Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* **71**: 101-132.
- Geng, Y., Q. Yu, E. Sicinska, M. Das, R. T. Bronson, P. Sicinski (2001). Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 194-199.
- Genomes Project, C., A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, E. P. Garrison, H. M. Kang, J. O. Korbel, J. L. Marchini, S. McCarthy, G. A. McVean, et al. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**(7571): 68-74.
- Georgakis, G. V., Y. Li, G. Z. Rassidakis, L. J. Medeiros, G. B. Mills, A. Younes (2006). Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* **132**(4): 503-511.
- Glasmacher, E., S. Agrawal, A. B. Chang, T. L. Murphy, W. Zeng, B. Vander Lugt, A. A. Khan, M. Ciofani, C. J. Spooner, S. Rutz, et al. (2012). A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science* **338**(6109): 975-980.
- Green, M. R., S. Monti, S. J. Rodig, P. Juszczynski, T. Currie, E. O'Donnell, B. Chapuy, K. Takeyama, D. Neuberg, T. R. Golub, et al. (2010). Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* **116**(17): 3268-3277.
- Green, M. R., S. Rodig, P. Juszczynski, J. Ouyang, P. Sinha, E. O'Donnell, D. Neuberg, M. A. Shipp (2012). Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* **18**(6): 1611-1618.
- Greiner, A., S. Tobollik, M. Buettner, B. Jungnickel, K. Herrmann, E. Kremmer, G. Niedobitek (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol* **205**(5): 541-547.
- Grötsch, B., S. Brachs, C. Lang, J. Luther, A. Derer, U. Schlotzer-Schrehardt, A. Bozec, S. Fillatreau, I. Berberich, E. Hobeika, et al. (2014). The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells. *J Exp Med* **211**(11): 2199-2212.
- Gunawardana, J., F. C. Chan, A. Telenius, B. Woolcock, R. Kridel, K. L. Tan, S. Ben-Neriah, A. Mottok, R. S. Lim, M. Boyle, et al. (2014). Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* **46**(4): 329-335.

- Hadzidimitriou, A., A. Agathangelidis, N. Darzentas, F. Murray, M. H. Delfau-Larue, L. B. Pedersen, A. N. Lopez, A. Dagklis, P. Rombout, K. Beldjord, et al. (2011). Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. Blood **118**(11): 3088-3095.
- Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, F. K. Stevenson (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood **94**(6): 1848-1854.
- Hanamoto, H., T. Nakayama, H. Miyazato, S. Takegawa, K. Hieshima, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, O. Yoshie (2004). Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. Am J Pathol **164**(3): 997-1006.
- Hao, X., X. Wei, F. Huang, Y. Wei, H. Zeng, L. Xu, Q. Zhou, R. Feng (2015). The expression of CD30 based on immunohistochemistry predicts inferior outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. PLoS One **10**(5): e0126615.
- Harada, S., H. Kalla, M. Balasubramanian, I. Brodsky, D. Gladstone, J. S. Hou (2008). Classical Hodgkin lymphoma concurrently evolving in a patient with marginal zone B-cell lymphoma of the spleen. Ann Diagn Pathol **12**(3): 212-216.
- Hedvat, M., D. Huszar, A. Herrmann, J. M. Gozgit, A. Schroeder, A. Sheehy, R. Buettner, D. Proia, C. M. Kowolik, H. Xin (2009). The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. Cancer cell **16**(6): 487-497.
- Hervé, M., K. Xu, Y.-S. Ng, H. Wardemann, E. Albesiano, B. T. Messmer, N. Chiorazzi, E. Meffre (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. Journal of Clinical Investigation **115**(6): 1636.
- Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. Science **322**(5904): 1097-1100.
- Hinz, M., P. Lemke, I. Anagnostopoulos, C. Hacker, D. Krappmann, S. Mathas, B. Dörken, M. Zenke, H. Stein, C. Scheidereit (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. J Exp Med **196**: 605-617.
- Hinz, M., P. Loser, S. Mathas, D. Krappmann, B. Dörken, C. Scheidereit (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Blood **97**(9): 2798-2807.
- Hirsch, B., M. Hummel, S. Bentink, F. Fouladi, R. Spang, R. Zollinger, H. Stein, H. Dürkop (2008). CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. Am J Pathol **172**(2): 510-520.
- Hu, S., Z. Y. Xu-Monette, A. Balasubramanyam, G. C. Manyam, C. Visco, A. Tzankov, W. M. Liu, R. N. Miranda, L. Zhang, S. Montes-Moreno, et al. (2013). CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Blood **121**(14): 2715-2724.
- Iacobelli, M., W. Wachsman, K. L. McGuire (2000). Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein. J Immunol **165**(2): 860-868.
- Iavarone, C., A. Catania, M. J. Marinissen, R. Visconti, M. Acunzo, C. Tarantino, M. S. Carlomagno, C. B. Bruni, J. S. Gutkind, M. Chiariello (2003). The platelet-derived growth factor controls c-myc

expression through a JNK- and AP-1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* **278**(50): 50024-50030.

Inghirami, G., L. Macri, E. Cesarman, A. Chadburn, J. Zhong, D. M. Knowles (1994). Molecular characterization of CD30+ anaplastic large-cell lymphoma: high frequency of c-myc proto-oncogene activation. *Blood* **83**(12): 3581-3590.

Inoue, T., R. Shinnakasu, W. Ise, C. Kawai, T. Egawa, T. Kurosaki (2017). The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *J Exp Med* **214**(4): 1181-1198.

Isaacson, P. G., A. J. Norton, B. J. Addis (1987). The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* **2**(8574): 1488-1491.

Ise, W., M. Kohyama, B. U. Schraml, T. Zhang, B. Schwer, U. Basu, F. W. Alt, J. Tang, E. M. Oltz, T. L. Murphy, et al. (2011). The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol* **12**(6): 536-543.

Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky, U. Weiss (1991). Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**(6352): 389-392.

Jaffe, E. S., A. Zarate-Osorno, D. W. Kingma, M. Raffeld, L. J. Medeiros (1994). The interrelationship between Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* **5 Suppl 1**: 7-11.

Janz, M., M. Hummel, M. Truss, B. Wollert-Wulf, S. Mathas, K. Johrens, C. Hagemeier, K. Bommert, H. Stein, B. Dörken, et al. (2006a). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **107**(6): 2536-2539.

Janz, M., M. Hummel, M. Truss, B. Wollert-Wulf, S. Mathas, K. Jöhrens, C. Hagemeier, K. Bommert, H. Stein, B. Dörken, et al. (2006b). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3) which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **107**: in press.

Jares, P., D. Colomer, E. Campo (2012). Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* **122**(10): 3416-3423.

Joos, S., M. Küpper, S. Ohl, F. von Bonin, G. Mechttersheimer, M. Bentz, P. Marynen, P. Möller, M. Pfreundschuh, L. Trümper, et al. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* **60**(3): 549-552.

Juilland, M., M. Gonzalez, T. Erdmann, Y. Banz, Z. Jevnikar, S. Hailfinger, A. Tzankov, M. Grau, G. Lenz, U. Novak, et al. (2016). CARMA1- and MyD88-dependent activation of Jun/ATF-type AP-1 complexes is a hallmark of ABC diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **127**(14): 1780-1789.

Jungnickel, B., A. Staratschek-Jox, A. Bräuninger, T. Spieker, J. Wolf, V. Diehl, M.-L. Hansmann, K. Rajewsky, R. Küppers (2000). Clonal deleterious mutations in the IκBa gene in the malignant cells in Hodgkin's disease. *J Exp Med* **191**(2): 395-401.

Juszczynski, P., J. Ouyang, S. Monti, S. J. Rodig, K. Takeyama, J. Abramson, W. Chen, J. L. Kutok, G. A. Rabinovich, M. A. Shipp (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(32): 13134-13139.

Kanzler, H., R. Kuppers, M. L. Hansmann, K. Rajewsky (1996a). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* **184**(4): 1495-1505.

- Kanzler, H., R. Küppers, M. L. Hansmann, K. Rajewsky (1996b). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J Exp Med **184**(4): 1495-1505.
- Kapp, U., J. Wolf, M. Hummel, M. Pawlita, C. von Kalle, F. Dallenbach, M. Schwonzen, G. R. F. Krueger, N. Müller-Lantzsch, C. Fonatsch, et al. (1993). Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice. Blood **82**(4): 1247-1256.
- Kapp, U., W. C. Yeh, B. Patterson, A. J. Elia, D. Kagi, A. Ho, A. Hessel, M. Tipsword, A. Williams, C. Mirtsos, et al. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. J Exp Med **189**(12): 1939-1946.
- Kiel, M. J., T. Velusamy, B. L. Betz, L. Zhao, H. G. Weigelin, M. Y. Chiang, D. R. Huebner-Chan, N. G. Bailey, D. T. Yang, G. Bhagat, et al. (2012). Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. J Exp Med **209**(9): 1553-1565.
- Kieser, A., E. Kilger, O. Gires, M. Ueffing, W. Kolch, W. Hammerschmidt (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. EMBO J **16**(21): 6478-6485.
- Kilger, E., A. Kieser, M. Baumann, W. Hammerschmidt (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. EMBO J **17**(6): 1700-1709.
- Klein, U., S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky, R. Dalla-Favera (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. Nat Immunol **7**(7): 773-782.
- Klein, U., K. Rajewsky, R. Küppers (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med **188**: 1679-1689.
- Kocks, C., K. Rajewsky (1988). Stepwise intracloal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8206-8210.
- Kocks, C., K. Rajewsky (1989). Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. Annu Rev Immunol **7**: 537-559.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. Gene **361**: 13-37.
- Kreher, S., M. A. Bouhlel, P. Cauchy, B. Lamprecht, S. Li, M. Grau, F. Hummel, K. Kochert, I. Anagnostopoulos, K. Johrens, et al. (2014). Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA **111**(42): E4513-4522.
- Kretz-Rommel, A., F. Qin, N. Dakappagari, R. Cofield, S. J. Faas, K. S. Bowdish (2008). Blockade of CD200 in the Presence or Absence of Antibody Effector Function: Implications for Anti-CD200 Therapy. The Journal of Immunology **180**(2): 699-705.
- Kube, D., U. Holtick, M. Vockerodt, T. Ahmadi, I. Behrmann, P. C. Heinrich, V. Diehl, H. Tesch (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. Blood **98**: 762-770.
- Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, N. Raab-Traub (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA **95**(20): 11963-11968.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer **5**(4): 251-262.
- Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. Nat Rev Cancer **9**(1): 15-27.

- Küppers, R. (2012). New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2012**: 328-334.
- Küppers, R., R. Dalla-Favera (2001a). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. Oncogene **20**(40): 5580-5594.
- Küppers, R., U. Dührsen, M. L. Hansmann (2014). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. Lancet Oncol **15**(10): e435-446.
- Küppers, R., A. Engert, M.-L. Hansmann (2012). Hodgkin lymphoma. J Clin Invest **122**: 3439-3447.
- Küppers, R., M. Hajadi, L. Plank, K. Rajewsky, M. L. Hansmann (1996). Molecular Ig gene analysis reveals that monocytoid B cell lymphoma is a malignancy of mature B cells carrying somatically mutated V region genes and suggests that rearrangement of the kappa-deleting element (resulting in deletion of the Ig kappa enhancers) abolishes somatic hypermutation in the human. Eur J Immunol **26**(8): 1794-1800.
- Küppers, R., U. Klein, M.-L. Hansmann, K. Rajewsky (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. N Engl J Med **341**: 1520-1529.
- Küppers, R., K. Rajewsky (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. Annu Rev Immunol **16**: 471-493.
- Küppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, G. Simons, R. Laumann, R. Fischer, M. L. Hansmann (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci USA **91**(23): 10962-10966.
- Küppers, R., A. B. Sousa, A. S. Baur, J. G. Strickler, K. Rajewsky, M. L. Hansmann (2001b). Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. Mol Med **7**(5): 285-292.
- Küppers, R., M. Zhao, M. L. Hansmann, K. Rajewsky (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J **12**(13): 4955-4967.
- Kurachi, M., R. A. Barnitz, N. Yosef, P. M. Odorizzi, M. A. Dilorio, M. E. Lemieux, K. Yates, J. Godec, M. G. Klatt, A. Regev, et al. (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. Nat Immunol **15**(4): 373-383.
- Kuwahara, M., W. Ise, M. Ochi, J. Suzuki, K. Kometani, S. Maruyama, M. Izumoto, A. Matsumoto, N. Takemori, A. Takemori, et al. (2016). Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. Nat Commun **7**: 12596.
- Kuzu, I., G. Delsol, M. Jones, K. C. Gatter, D. Y. Mason (1993). Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease. Histopathol **22**(2): 141-144.
- Laimer, D., H. Dolznig, K. Kollmann, P. W. Vesely, M. Schleiderer, O. Merkel, A. I. Schiefer, M. R. Hassler, S. Heider, L. Amenitsch, et al. (2012). PDGFR blockade is a rational and effective therapy for NPM-ALK-driven lymphomas. Nat Med **18**(11): 1699-1704.
- Lake, A., L. A. Shield, P. Cordano, D. T. Chui, J. Osborne, S. Crae, K. S. Wilson, S. Tosi, S. J. Knight, S. Gesk, et al. (2009). Mutations of NFKBIA, encoding I κ B α , are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. Int J Cancer **125**(6): 1334-1342.
- Lam, L. T., G. Wright, R. E. Davis, G. Lenz, P. Farinha, L. Dang, J. W. Chan, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, L. M. Staudt (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of

transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood **111**(7): 3701-3713.

Lamprecht, B., S. Kreher, I. Anagnostopoulos, K. Johrens, G. Monteleone, F. Jundt, H. Stein, M. Janz, B. Dorken, S. Mathas (2008). Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. Blood **112**(8): 3339-3347.

Lebecque, S., O. de Bouteiller, C. Arpin, J. Banchereau, Y. J. Liu (1997). Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. J Exp Med **185**(3): 563-571.

Lee, C. H., M. Melchers, H. Wang, T. A. Torrey, R. Slota, C. F. Qi, J. Y. Kim, P. Lugar, H. J. Kong, L. Farrington, et al. (2006). Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. J Exp Med **203**(1): 63-72.

Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2017). from <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html>.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, S. Genome Project Data Processing (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics **25**(16): 2078-2079.

Li, J. Y., F. Gaillard, A. Moreau, J. L. Harousseau, C. Labois, N. Milpied, R. Bataille, H. Avet-Loiseau (1999). Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol **154**(5): 1449-1452.

Li, P., R. Spolski, W. Liao, L. Wang, T. L. Murphy, K. M. Murphy, W. J. Leonard (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. Nature **490**(7421): 543-546.

Logan, M. R., K. L. Jordan-Williams, S. Poston, J. Liao, E. J. Taparowsky (2012). Overexpression of Batf induces an apoptotic defect and an associated lymphoproliferative disorder in mice. Cell Death Dis **3**: e310.

Lollies, A., S. Hartmann, M. Schneider, T. Bracht, A. L. Weiss, J. Arnolds, L. Klein-Hitpass, B. Sitek, M. L. Hansmann, R. Küppers, et al. (2017). An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. Leukemia.

Ma, X., H. Zhang, L. Yuan, H. Jing, P. Thacker, D. Li (2011). CREBL2, interacting with CREB, induces adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Biochemical Journal **439**(1): 27-38.

MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. Annu Rev Immunol **12**: 117-139.

Mancao, C., M. Altmann, B. Jungnickel, W. Hammerschmidt (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. Blood **106**(13): 4339-4344.

Mansfeld, J., P. Collin, M. O. Collins, J. S. Choudhary, J. Pines (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. Nature cell biology **13**(10): 1234.

Marafioti, T., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, H. D. Foss, B. Falini, G. Delsol, P. G. Isaacson, S. Pileri, H. Stein (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. N Engl J Med **337**(7): 453-458.

Marafioti, T., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, H. D. Foss, D. Huhn, H. Stein (1999). Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. J Clin Oncol **17**(12): 3804-3809.

Martin-Subero, J. I., S. Gesk, L. Harder, T. Sonoki, P. W. Tucker, B. Schlegelberger, W. Grote, F. J. Novo, M. J. Calasanz, M. L. Hansmann, et al. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. Blood **99**(4): 1474-1477.

- Martin-Subero, J. I., W. Klapper, A. Sotnikova, E. Callet-Bauchu, L. Harder, C. Bastard, R. Schmitz, S. Grohmann, J. Hoppner, J. Riemke, et al. (2006). Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. Cancer Res **66**(21): 10332-10338.
- Martin-Subero, J. I., C. Renné, S. Grohmann, L. Harder, R. Schmitz, R. M. Parwaresch, S. Küppers, M. L. Hansmann, R. Siebert (2004). Chromosomal rearrangements affecting the BCL6, MYC and MALT1 loci are rare events in classical Hodgkin lymphoma. Eur J Hematol **73** (suppl. 65): B23 (Abstract).
- Mathas, S., S. Hartmann, R. Kuppers (2016). Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. Semin Hematol **53**(3): 139-147.
- Mathas, S., M. Hinz, I. Anagnostopoulos, D. Krappmann, A. Lietz, F. Jundt, K. Bommert, F. Mehta-Grigoriou, H. Stein, B. Dörken, et al. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. EMBO J **21**(15): 4104-4113.
- Mathas, S., S. Kreher, K. J. Meaburn, K. Johrens, B. Lamprecht, C. Assaf, W. Sterry, M. E. Kadin, M. Daibata, S. Joos, et al. (2009). Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5831-5836.
- McBlane, J. F., D. C. van Gent, D. A. Ramsden, C. Romeo, C. A. Cuomo, M. Gellert, M. A. Oettinger (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. Cell **83**(3): 387-395.
- Meggetto, F., C. Muller, S. Henry, J. Selves, B. Mariame, P. Brousset, T. A. Saati, G. Delsol (1996). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells. Blood **87**(6): 2435-2442.
- Meixner, A., F. Karreth, L. Kenner, E. F. Wagner (2004). JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. EMBO J **23**(6): 1325-1335.
- Mir, S. S., B. W. Richter, C. S. Duckett (2000). Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. Blood **96**(13): 4307-4312.
- Möller, P., W. J. Hofmann, B. Mielke, H. F. Otto (1989). [Primary mediastinal, clear cell B-cell lymphoma is an epithelium-associated thymus lymphoma]. Pathologe **10**(4): 234-239.
- Möller, P., B. Lammler, B. Herrmann, H. F. Otto, G. Moldenhauer, F. Momburg (1986). The primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type has variable defects in MHC antigen expression. Immunology **59**(3): 411-417.
- Montoto, S., J. Fitzgibbon (2011). Transformation of indolent B-cell lymphomas. J Clin Oncol **29**(14): 1827-1834.
- Morgan, R. A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, W. F. Anderson (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. Nucleic Acids Res **20**(6): 1293-1299.
- Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware, E. Kieff (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. Cell **80**(3): 389-399.
- Murphy, K., C. Weaver (2016). Janeway's immunobiology, Garland Science.

- Murphy, T. L., R. Tussiwand, K. M. Murphy (2013). Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. Nat Rev Immunol **13**(7): 499-509.
- Müschen, M., R. Küppers, T. Spieker, A. Bräuninger, K. Rajewsky, M. L. Hansmann (2001). Molecular single-cell analysis of Hodgkin- and Reed-Sternberg cells harboring unmutated immunoglobulin variable region genes. Lab Invest **81**: 289-295.
- Müschen, M., K. Rajewsky, A. Bräuninger, A. S. Baur, J. J. Oudejans, A. Roers, M.-L. Hansmann, R. Küppers (2000). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. J Exp Med **191**(2): 387-394.
- Nagaoka, H., M. Muramatsu, N. Yamamura, K. Kinoshita, T. Honjo (2002). Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin Smu region: implication of AID involvement in a common step of class switch recombination and somatic hypermutation. J Exp Med **195**(4): 529-534.
- Narurkar, R., M. Alkayem, D. Liu (2016). SOX11 is a biomarker for cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. Biomark Res **4**: 6.
- Navarro, A., G. Clot, C. Royo, P. Jares, A. Hadzidimitriou, A. Agathangelidis, V. Bikos, N. Darzentas, T. Papadaki, I. Salaverria, et al. (2012). Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. Cancer Res **72**(20): 5307-5316.
- Ngo, V. N., R. M. Young, R. Schmitz, S. Jhavar, W. Xiao, K. H. Lim, H. Kohlhammer, W. Xu, Y. Yang, H. Zhao, et al. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature **470**(7332): 115-119.
- Novak, U., A. Rinaldi, I. Kwee, S. V. Nandula, P. M. Rancoita, M. Compagno, M. Cerri, D. Rossi, V. V. Murty, E. Zucca, et al. (2009). The NF-(kappa)B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone B-cell lymphomas. Blood **113**: 4918-4921.
- Ochiai, K., M. Maienschein-Cline, G. Simonetti, J. Chen, R. Rosenthal, R. Brink, A. S. Chong, U. Klein, A. R. Dinner, H. Singh (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. Immunity **38**(5): 918-929.
- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, D. Baltimore (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. Science **248**(4962): 1517-1523.
- Overbeck, B. M., J. I. Martin-Subero, O. Ammerpohl, W. Klapper, R. Siebert, M. Giefing (2012). ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica **97**(10): 1612-1614.
- Palumbo, G. A., N. Parrinello, G. Fargione, K. Cardillo, A. Chiarenza, S. Berretta, C. Conticello, L. Villari, F. Di Raimondo (2009). CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res **33**(9): 1212-1216.
- Papoudou-Bai, A., A. Barbouti, V. Galani, K. Stefanaki, P. Kanavaros (2015). Immunohistological analysis of the jun family and the signal transducers and activators of transcription in thymus. Anat Res Int **2015**: 541582.
- Papoudou-Bai, A., A. Barbouti, V. Galani, K. Stefanaki, D. Rontogianni, P. Kanavaros (2016a). Expression of cell cycle and apoptosis regulators in thymus and thymic epithelial tumors. Clin Exp Med **16**(2): 147-159.
- Papoudou-Bai, A., E. Hatzimichael, A. Barbouti, P. Kanavaros (2016b). Expression patterns of the activator protein-1 (AP-1) family members in lymphoid neoplasms. Clin Exp Med.
- Pardanani, A. (2011). JAK2 inhibitors in myelofibrosis. Clin Adv Hematol Oncol **9**(11): 856-858.

- Pardanani, A., J. Hood, T. Lasho, R. Levine, M. Martin, G. Noronha, C. Finke, C. Mak, R. Mesa, H. Zhu (2007a). TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* **21**(8): 1658.
- Pardanani, A., T. Lasho, C. Finke, C. A. Hanson, A. Tefferi (2007b). Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* **21**(9): 1960.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, N. Fracchiolla, C. William, A. Neri, L. Baldini, R. S. K. Chaganti, U. Klein, R. Küppers, K. Rajewsky, et al. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11816-11821.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Küppers, R. Dalla-Favera (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**(6844): 341-346.
- Perez-Galan, P., M. Dreyling, A. Wiestner (2011). Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* **117**(1): 26-38.
- Perfetti, V., M. C. Vignarelli, G. Palladini, V. Navazza, C. Giachino, G. Merlini (2004). Insights into the regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements via analysis of the kappa light chain locus in lambda myeloma. *Immunology* **112**(3): 420-427.
- Perry, J. S., C. W. Lio, A. L. Kau, K. Nutsch, Z. Yang, J. I. Gordon, K. M. Murphy, C. S. Hsieh (2014). Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity* **41**(3): 414-426.
- Pongubala, J. M., D. L. Northrup, D. W. Lancki, K. L. Medina, T. Treiber, E. Bertolino, M. Thomas, R. Grosschedl, D. Allman, H. Singh (2008). Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol* **9**(2): 203-215.
- Porter, A. G., R. U. Janicke (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**(2): 99-104.
- Pro, B., R. Advani, P. Brice, N. L. Bartlett, J. D. Rosenblatt, T. Illidge, J. Matous, R. Ramchandren, M. Fanale, J. M. Connors, et al. (2012). Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* **30**(18): 2190-2196.
- Quesada, V., L. Conde, N. Villamor, G. R. Ordonez, P. Jares, L. Bassaganyas, A. J. Ramsay, S. Bea, M. Pinyol, A. Martinez-Trillos, et al. (2011). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **44**(1): 47-52.
- Quesada, V., A. J. Ramsay, D. Rodriguez, X. S. Puente, E. Campo, C. Lopez-Otin (2013). The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *BMC Med* **11**: 124.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**(6585): 751-758.
- Re, D., M. Müschen, T. Ahmadi, C. Wickenhauser, A. Staratschek-Jox, U. Holtick, V. Diehl, J. Wolf (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* **61**(5): 2080-2084.
- Reed, D. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep* **10**: 133-193.
- Reichel, J., A. Chadburn, P. G. Rubinstein, L. Giulino-Roth, W. Tam, Y. Liu, R. Gaiolla, K. Eng, J. Brody, G. Inghirami, et al. (2015). Flow-sorting and exome sequencing reveals the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* **125**(7): 1061-1072.

Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravalles, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt, L. H. Glimcher (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**(6844): 300-307.

Renné, C., N. Hinsch, K. Willenbrock, M. Fuchs, W. Klapper, A. Engert, R. Küppers, M. L. Hansmann, A. Bräuninger (2007). The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **120**(11): 2504-2509.

Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Labelouse, A. Gennery, et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**(5): 565-575.

Rinaldi, A., F. Forconi, L. Arcaini, M. Mian, E. Sozzi, S. Zibellini, L. Baldini, S. Franceschetti, G. Gaidano, R. Marasca, et al. (2010). Immunogenetics features and genomic lesions in splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* **151**(5): 435-439.

Ritz, O., K. Rommel, K. Dorsch, E. Kelsch, J. Melzner, M. Buck, K. Leroy, V. Papadopoulou, S. Wagner, R. Marienfeld, et al. (2013). STAT6-mediated BCL6 repression in primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). *Oncotarget* **4**(7): 1093-1102.

Rodig, S. J., J. Ouyang, P. Juszczynski, T. Currie, K. Law, D. S. Neuberg, G. A. Rabinovich, M. A. Shipp, J. L. Kutok (2008). AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin Cancer Res* **14**(11): 3338-3344.

Rosenquist, R., F. Menestrina, M. Lestani, R. Küppers, M. L. Hansmann, A. Bräuninger (2004a). Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. *Lab Invest* **84**: 253-262.

Rosenquist, R., G. Roos, M. Erlanson, R. Küppers, A. Bräuninger, M. L. Hansmann (2004b). Clonally related splenic marginal zone lymphoma and Hodgkin lymphoma with unmutated V gene rearrangements and a 15-yr time gap between diagnoses. *Eur J Haematol* **73**(3): 210-214.

Rosenwald, A., G. Wright, K. Leroy, X. Yu, P. Gaulard, R. D. Gascoyne, W. C. Chan, T. Zhao, C. Haioun, T. C. Greiner, et al. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* **198**(6): 851-862.

Rossi, D., S. Deaglio, D. Dominguez-Sola, S. Rasi, T. Vaisitti, C. Agostinelli, V. Spina, A. Bruscaggin, S. Monti, M. Cerri, et al. (2011). Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* **118**(18): 4930-4934.

Rui, L., N. C. Emre, M. J. Kruhlak, H. J. Chung, C. Steidl, G. Slack, G. W. Wright, G. Lenz, V. N. Ngo, A. L. Shaffer, et al. (2010). Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell* **18**(6): 590-605.

Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.

Sanz, I. (1991). Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *the Journal of Immunology* **147**(5): 1720-1729.

Savage, K. J., N. L. Harris, J. M. Vose, F. Ullrich, E. S. Jaffe, J. M. Connors, L. Rimsza, S. A. Pileri, M. Chhanabhai, R. D. Gascoyne, et al. (2008). ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* **111**(12): 5496-5504.

- Savage, K. J., S. Monti, J. L. Kutok, G. Cattoretti, D. Neuberg, L. De Leval, P. Kurtin, P. Dal Cin, C. Ladd, F. Feuerhake, et al. (2003). The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**(12): 3871-3879.
- Schaffner, C., I. Idler, S. Stilgenbauer, H. Dohner, P. Lichter (2000). Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2773-2778.
- Scheeren, F. A., S. A. Diehl, L. A. Smit, T. Beaumont, M. Naspetti, R. J. Bende, B. Blom, K. Karube, K. Ohshima, C. J. van Noesel, et al. (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5; evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* **111**(9): 4706-4715.
- Schmitz, R., M. L. Hansmann, V. Bohle, J. I. Martin-Subero, S. Hartmann, G. Mechttersheimer, W. Klapper, I. Vater, M. Giefing, S. Gesk, et al. (2009). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* **206**(5): 981-989.
- Schmitz, R., C. Renné, R. Rosenquist, M. Tinguely, V. Distler, F. Menestrina, M. Lestani, T. Stankovic, B. Austen, A. Bräuninger, et al. (2005). Insight into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* **19**: 1452-1458.
- Schneider, S., B. Crescenzi, M. Schneider, S. Ascani, S. Hartmann, M. L. Hansmann, B. Falini, C. Mecucci, E. Tiacci, R. Küppers (2014). Subclonal evolution of a classical Hodgkin lymphoma from a germinal center B-cell-derived mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* **134**(4): 832-843.
- Schraml, B. U., K. Hildner, W. Ise, W. L. Lee, W. A. Smith, B. Solomon, G. Sahota, J. Sim, R. Mukasa, S. Cemurski, et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**(7253): 405-409.
- Schwering, I., A. Bräuninger, V. Distler, J. Jesdinsky, V. Diehl, M. L. Hansmann, K. Rajewsky, R. Küppers (2003a). Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol Med* **9**: 85-95.
- Schwering, I., A. Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, M. L. Hansmann, R. Dalla-Favera, K. Rajewsky, R. Kuppers (2003b). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(4): 1505-1512.
- Seifert, M., R. Küppers (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* **206**(12): 2659-2669.
- Seitz, V., P. Butzhammer, B. Hirsch, J. Hecht, I. Gutgemann, A. Ehlers, D. Lenze, E. Oker, A. Sommerfeld, E. von der Wall, et al. (2011). Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One* **6**(11): e26837.
- Seitz, V., M. Hummel, T. Marafioti, I. Anagnostopoulos, C. Assaf, H. Stein (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* **95**(10): 3020-3024.
- Shaffer, A. L., N. C. Emre, L. Lamy, V. N. Ngo, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, S. Dave, X. Yu, H. Zhao, et al. (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* **454**(7201): 226-231.
- Shaffer, A. L., K. I. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltzane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**(1): 51-62.
- Shalem, O., N. E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D. A. Scott, T. Mikkelsen, D. Heckl, B. L. Ebert, D. E. Root, J. G. Doench, et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**(6166): 84-87.

- Shaulian, E. (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cell Signal **22**(6): 894-899.
- Shaulian, E., M. Karin (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene **20**(19): 2390-2400.
- Shen, H. M., A. Peters, B. Baron, X. Zhu, U. Storb (1998). Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. Science **280**: 1750-1752.
- Siminovitch, K. A., A. Bakhshi, P. Goldman, S. J. Korsmeyer (1985). A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. Nature **316**: 260-262.
- Skinnider, B. F., A. J. Elia, R. D. Gascoyne, B. Patterson, L. Trümper, U. Kapp, T. W. Mak (2002a). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood **99**: 618-626.
- Skinnider, B. F., A. J. Elia, R. D. Gascoyne, L. H. Trumper, F. von Bonin, U. Kapp, B. Patterson, B. E. Snow, T. W. Mak (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood **97**(1): 250-255.
- Skinnider, B. F., T. W. Mak (2002b). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. Blood **99**(12): 4283-4297.
- Smith, J. P., G. F. Burton, J. G. Tew, A. K. Szakal (1998). Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. Dev Immunol **6**(3-4): 285-294.
- Staber, P. B., P. Vesely, N. Haq, R. G. Ott, K. Funato, I. Bambach, C. Fuchs, S. Schauer, W. Linkesch, A. Hrenjak, et al. (2007). The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. Blood **110**(9): 3374-3383.
- Stamatopoulos, K., C. Belessi, C. Moreno, M. Boudjograh, G. Guida, T. Smilevska, L. Belhoul, S. Stella, N. Stavroyianni, M. Crespo, et al. (2007). Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. Blood **109**(1): 259-270.
- Steidl, C., A. Diepstra, T. Lee, F. C. Chan, P. Farinha, K. Tan, A. Telenius, L. Barclay, S. P. Shah, J. M. Connors, et al. (2012). Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. Blood **120**(17): 3530-3540.
- Steidl, C., S. P. Shah, B. W. Woolcock, L. Rui, M. Kawahara, P. Farinha, N. A. Johnson, Y. Zhao, A. Telenius, S. B. Neriah, et al. (2011). MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. Nature **471**(7338): 377-381.
- Stein, H., T. Marafioti, H. D. Foss, H. Laumen, M. Hummel, I. Anagnostopoulos, T. Wirth, G. Demel, B. Falini (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. Blood **97**(2): 496-501.
- Stein, H., D. Y. Mason, J. Gerdes, N. O'Connor, J. Wainscoat, G. Pallesen, K. Gatter, B. Falini, G. Delsol, H. Lemke, et al. (1985). The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. Blood **66**(4): 848-858.
- Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. Z Heilkunde **19**: 21-90.
- Stevens, D., R. Gassmann, K. Oegema, A. Desai (2011). Uncoordinated loss of chromatid cohesion is a common outcome of extended metaphase arrest. PLoS One **6**(8): e22969.

- Stevenson, F. K., S. S. Sahota, C. H. Ottensmeier, D. Zhu, F. Forconi, T. J. Hamblin (2001). The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. Adv Cancer Res **83**: 81-116.
- Su, Z. Z., S. G. Lee, L. Emdad, I. V. Lebdeva, P. Gupta, K. Valerie, D. Sarkar, P. B. Fisher (2008). Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN). Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20906-20911.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA **102**(43): 15545-15550.
- Suzuki, R., Y. Kagami, K. Takeuchi, M. Kami, M. Okamoto, R. Ichinohasama, N. Mori, M. Kojima, T. Yoshino, H. Yamabe, et al. (2000). Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. Blood **96**(9): 2993-3000.
- Swerdlow, S., E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. Vardiman (2008). WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Ed.(2008).
- Szremska, A. P., L. Kenner, E. Weisz, R. G. Ott, E. Passegue, M. Artwohl, M. Freissmuth, R. Stoxreiter, H. C. Theussl, S. B. Parzer, et al. (2003). JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. Blood **102**(12): 4159-4165.
- Takahashi, N., S. Ueda, M. Obata, T. Nikaido, S. Nakai, T. Honjo (1982). Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family. Cell **29**(2): 671-679.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson, P. Leder (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7837-7841.
- Tiacci, E., C. Döring, V. Brune, C. J. van Noesel, W. Klapper, G. Mechttersheimer, B. Falini, R. Küppers, M. L. Hansmann (2012). Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. Blood **120**(23): 4609-4620.
- Tinguely, M., R. Rosenquist, C. Sundstrom, R. M. Amini, R. Kuppers, M. L. Hansmann, A. Brauninger (2003). Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. Am J Surg Pathol **27**(11): 1483-1488.
- Torlakovic, E., A. Tierens, H. D. Dang, J. Delabie (2001). The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. Am J Pathol **159**(5): 1807-1814.
- Turturro, F., A. Y. Frist, M. D. Arnold, A. Pal, G. A. Cook, P. Seth (2001a). Comparison of the effects of recombinant adenovirus-mediated expression of wild-type p53 and p27Kip1 on cell cycle and apoptosis in SUDHL-1 cells derived from anaplastic large cell lymphoma. Leukemia **15**(8): 1225-1231.
- Turturro, F., A. Y. Frist, M. D. Arnold, P. Seth, K. Pulford (2001b). Biochemical differences between SUDHL-1 and KARPAS 299 cells derived from t(2;5)-positive anaplastic large cell lymphoma are responsible for the different sensitivity to the antiproliferative effect of p27(Kip1). Oncogene **20**(33): 4466-4475.
- Tussiwand, R., W. L. Lee, T. L. Murphy, M. Mashayekhi, W. Kc, J. C. Albring, A. T. Satpathy, J. A. Rotondo, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. Nature **490**(7421): 502-507.
- Ushmorov, A., F. Leithäuser, O. Sakk, A. Weinhausel, S. W. Popov, P. Möller, T. Wirth (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. Blood **107**(6): 2493-2500.

- Ushmorov, A., O. Ritz, M. Hummel, F. Leithauser, P. Möller, H. Stein, T. Wirth (2004). Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. Blood **104**(10): 3326-3334.
- van den Berg, A., E. Maggio, R. Rust, K. Kooistra, A. Diepstra, S. Poppema (2002). Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma. Blood **100**(4): 1425-1429.
- Vasanwala, F. H., S. Kusam, L. M. Toney, A. L. Dent (2002). Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. J Immunol **169**(4): 1922-1929.
- Vegliante, M. C., J. Palomero, P. Perez-Galan, G. Roue, G. Castellano, A. Navarro, G. Clot, A. Moros, H. Suarez-Cisneros, S. Bea, et al. (2013). SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. Blood **121**(12): 2175-2185.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- Victora, G. D., T. A. Schwickert, D. R. Fooksman, A. O. Kamphorst, M. Meyer-Hermann, M. L. Dustin, M. C. Nussenzweig (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. Cell **143**(4): 592-605.
- Vockerodt, M., S. L. Morgan, M. Kuo, W. Wei, M. B. Chukwuma, J. R. Arrand, D. Kube, J. Gordon, L. S. Young, C. B. Woodman, et al. (2008). The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. J Pathol **216**(1): 83-92.
- Watanabe, K., Y. Yamashita, A. Nakayama, Y. Hasegawa, H. Kojima, T. Nagasawa, N. Mori (2000). Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. Histopathol **36**(4): 353-361.
- Watanabe, M., Y. Ogawa, K. Ito, M. Higashihara, M. E. Kadin, L. J. Abraham, T. Watanabe, R. Horie (2003). AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Am J Pathol **163**(2): 633-641.
- Watanabe, M., M. Sasaki, K. Itoh, M. Higashihara, K. Umezawa, M. E. Kadin, L. J. Abraham, T. Watanabe, R. Horie (2005). JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Cancer Res **65**(17): 7628-7634.
- Weber-Matthiesen, K., J. Deerberg, M. Poetsch, W. Grote, B. Schlegelberger (1995). Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. Blood **86**(4): 1464-1468.
- Weber, K., U. Bartsch, C. Stocking, B. Fehse (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. Mol Ther **16**(4): 698-706.
- Weilemann, A., M. Grau, T. Erdmann, O. Merkel, U. Sobhiashar, I. Anagnostopoulos, M. Hummel, A. Siegert, C. Hayford, H. Madle, et al. (2015). Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. Blood **125**(1): 124-132.
- Wein, F., R. Küppers (2016). The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. J Leukoc Biol **99**(1): 45-50.
- Welzel, N., T. Le, R. Marculescu, G. Mitterbauer, A. Chott, C. Pott, M. Kneba, M. Q. Du, R. Kusec, J. Drach, et al. (2001). Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. Cancer Res **61**(4): 1629-1636.

- Weniger, M. A., I. Melzner, C. K. Menz, S. Wegener, A. J. Bucur, K. Dorsch, T. Mattfeldt, T. F. Barth, P. Möller (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Oncogene **25**(18): 2679-2684.
- Wernig, G., M. G. Kharas, R. Okabe, S. A. Moore, D. S. Leeman, D. E. Cullen, M. Gozo, E. P. McDowell, R. L. Levine, J. Doukas, et al. (2008). Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. Cancer Cell **13**(4): 311-320.
- Willenbrock, K., R. Küppers, C. Renne, V. Brune, S. Eckerle, E. Weidmann, A. Bräuninger, M. L. Hansmann (2006). Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica **91**(5): 596-604.
- Younes, A., N. L. Bartlett, J. P. Leonard, D. A. Kennedy, C. M. Lynch, E. L. Sievers, A. Forero-Torres (2010). Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. N Engl J Med **363**(19): 1812-1821.
- Young, L. S., P. G. Murray (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene **22**(33): 5108-5121.
- Zamo, A., R. Chiarle, R. Piva, J. Howes, Y. Fan, M. Chilosi, D. E. Levy, G. Inghirami (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. Oncogene **21**(7): 1038-1047.
- Zeidan, A., B. Faltas, P. Forde, A. Subhawong, C. Bello, J. Bolanos-Meade (2013). Sequential occurrence of a splenic marginal zone lymphoma, extranodal MALT lymphoma, and Hodgkin lymphoma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk **13**(4): 496-498.
- Zhang, W., H. T. Liu (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res **12**(1): 9-18.
- Zhang, Y., L. Zhou, C. A. Miller (1998). A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2586-2591.
- Zibellini, S., D. Capello, F. Forconi, P. Marcatili, D. Rossi, S. Rattotti, S. Franceschetti, E. Sozzi, E. Cencini, R. Marasca, et al. (2010). Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. Haematologica **95**(10): 1792-1796.
- Zong, C., S. Lu, A. R. Chapman, X. S. Xie (2012). Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. Science **338**(6114): 1622-1626.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 23: Signifikant regulierte Gene in shBATF3-transduzierten L-428-Zellen.

Gensymbol	Referenz-sequenz	shNT #1	shNT #2	shNT #3	shBATF3 #1	shBATF3 #2	shBATF3 #3	FC*	p-Wert**
BATF3	NM_018664	10,27	10,91	10,35	9,39	10,13	9,33	-1,86	0,0058
LPGAT1	NM_014873	8,38	8,68	8,63	7,52	7,99	7,71	-1,77	0,0076
SNORA76	NR_002995	8,53	8,57	8,69	7,53	7,76	8,19	-1,70	0,0334
SLC9A7P1	NR_033801	6,25	5,59	5,10	5,38	4,62	4,67	-1,69	0,0438
MIR196A1	NR_029582	6,47	5,56	7,06	5,90	4,70	6,32	-1,65	0,0133
SNORD15B	NR_000025	11,14	11,53	11,54	10,34	10,95	10,89	-1,60	0,0088
ACOT9	ENST00000379303	8,39	8,78	8,15	7,61	8,18	7,56	-1,58	0,0081
ROGDI	NM_024589	6,85	6,80	6,76	6,12	6,24	6,09	-1,58	0,0057
CREBL2	NM_001310	7,40	7,57	7,91	6,75	7,06	7,15	-1,56	0,0132
FAM153B	NM_001265615	5,54	5,75	5,26	4,85	4,91	4,90	-1,55	0,0456
SNORD37	NR_002602	8,59	8,57	8,52	7,73	8,16	7,95	-1,53	0,0434
SNORA84	NR_003704	8,89	8,52	8,76	8,12	8,03	8,20	-1,52	0,0193
LOC401357	JX508854	5,78	5,90	6,02	5,41	5,19	5,32	-1,51	0,0323
SNORD111	NR_003079	9,27	9,58	9,59	8,62	9,20	8,94	-1,47	0,0245
MIR4530	NR_039755	7,15	7,28	7,16	6,69	6,53	6,71	-1,47	0,0320
SNORD17	NR_003045	7,45	7,50	7,54	6,80	7,03	7,03	-1,45	0,0096
SNORD51	NR_002589	11,08	10,48	11,01	10,40	10,00	10,68	-1,41	0,0369
SNORD12B	NR_003695	9,54	9,60	10,04	9,01	8,92	9,75	-1,41	0,0474
PATL1	NM_152716	11,48	11,42	11,56	11,14	10,99	10,88	-1,40	0,0408
SNORA21	NR_002576	9,33	9,63	9,72	8,88	9,04	9,31	-1,40	0,0118
SNORA68	NR_000012	11,15	11,18	11,22	10,50	10,70	10,93	-1,39	0,0448
PRR5L	NM_001160167	5,79	5,52	5,95	5,30	4,94	5,61	-1,39	0,0213
RNU4ATAC	NR_023343	10,73	10,57	11,05	10,21	10,26	10,54	-1,37	0,0212
ANAPC15	NM_014042	7,81	7,49	7,64	7,33	7,21	7,06	-1,36	0,0389
SNORA37	NR_002970	8,95	9,23	9,47	8,65	8,60	9,08	-1,36	0,0467
E124	NM_004879	8,71	9,02	8,89	8,26	8,74	8,31	-1,35	0,0372
OMP	NM_006189	7,30	7,41	7,61	6,83	7,03	7,17	-1,34	0,0044
LOC100130557	NR_024567	7,29	7,53	7,49	6,86	7,23	6,94	-1,34	0,0284
SNORD75	NR_003941	9,60	9,40	10,38	9,13	8,88	10,09	-1,34	0,0242
HAR1A	NR_003244	6,06	5,75	6,00	5,78	5,32	5,46	-1,34	0,0322
SNORD69	NR_003057	10,79	11,36	11,58	10,51	10,88	11,09	-1,34	0,0243
FAR1-IT1	OTTHUMT0000386209	6,39	6,47	6,38	5,90	6,06	6,03	-1,33	0,0101
TMEM132C	NM_001136103	6,05	5,88	6,12	5,52	5,65	5,63	-1,33	0,0478
SNORD126	NR_003693	5,77	6,37	6,45	5,51	5,81	6,05	-1,32	0,0413
LRFN4	NM_024036	6,66	6,78	6,45	6,18	6,44	6,06	-1,32	0,0090
EPHB3	NM_004443	5,70	5,45	5,70	5,21	5,15	5,27	-1,32	0,0173
NDUFB7	NM_004146	8,01	8,08	7,81	7,58	7,77	7,36	-1,32	0,0121
SNORA9	NR_002952	10,23	10,14	10,40	9,75	9,73	10,10	-1,32	0,0174
SLC2A4	NM_001042	5,96	6,26	5,76	5,55	5,87	5,39	-1,31	0,0006
HSD11B2	NM_000196	6,84	7,17	6,94	6,38	6,79	6,60	-1,31	0,0083
SNORD63	NR_002913	9,35	9,67	10,07	8,92	9,42	9,59	-1,31	0,0305
TMED8	ENST00000216468	9,14	9,28	9,35	8,91	8,88	8,82	-1,31	0,0469
SNORA64	NR_002326	9,06	9,14	9,33	8,65	8,90	8,83	-1,31	0,0350

SNORA54	NR_002982	8,13	8,14	7,95	7,77	7,68	7,61	-1,31	0,0096
TMEM74	NM_153015	5,87	5,82	5,88	5,36	5,45	5,62	-1,30	0,0327
NFATC2IP	NM_032815	8,90	9,23	9,07	8,52	8,75	8,79	-1,30	0,0237
BCAS4	NM_017843	6,37	6,68	6,56	6,87	7,05	6,83	1,30	0,0279
JAK2	NM_004972	9,19	8,96	9,09	9,74	9,30	9,34	1,30	0,0460
STRADB	NM_018571	6,45	6,39	6,83	6,86	6,68	7,28	1,30	0,0180
RNA5SP194	ENST00000364662	6,09	6,14	5,48	6,37	6,52	5,98	1,31	0,0250
CPXM1	NM_019609	6,28	6,26	6,31	6,66	6,58	6,77	1,31	0,0100
SEPHS1	NM_012247	10,67	10,64	10,38	10,94	11,16	10,78	1,32	0,0334
ZFYVE9	NM_004799	5,78	6,08	5,77	6,15	6,47	6,21	1,32	0,0027
MAP3K8	AB209539	9,05	8,97	9,01	9,53	9,31	9,41	1,32	0,0089
HIST2H3D	NM_001123375	8,65	9,83	9,16	9,17	10,29	9,40	1,32	0,0410
MIR3936	NR_037500	5,02	5,41	5,30	5,26	5,95	5,73	1,33	0,0460
KHDC1L	NM_001126063	4,93	5,06	4,86	5,19	5,61	5,29	1,33	0,0380
NTF4	NM_006179	5,19	5,32	5,38	5,65	5,80	5,67	1,33	0,0204
CCNE2	NM_057749	6,29	6,66	6,96	6,66	7,07	7,42	1,33	0,0044
TLE4	NM_007005	5,90	6,01	6,13	6,35	6,46	6,48	1,33	0,0063
FAM171A1	NM_001010924	8,04	8,40	8,75	8,61	8,84	9,01	1,34	0,0454
IFI44L	NM_006820	7,59	7,51	7,84	8,12	7,94	8,15	1,34	0,0198
CLEC18A	NM_182619	4,99	5,32	5,10	5,30	5,75	5,61	1,34	0,0198
MAOA	NM_001270458	8,29	8,65	8,15	8,65	9,16	8,57	1,34	0,0104
ALPI	NM_001631	5,67	5,65	5,25	6,10	6,03	5,73	1,35	0,0045
PDE4D	NM_001165899	5,70	5,82	6,20	6,28	6,17	6,56	1,35	0,0305
MIR548AL	NR_039710	7,52	7,05	6,95	8,08	7,38	7,36	1,35	0,0240
BMPR1B	NM_001203	8,00	7,86	7,83	8,62	8,20	8,19	1,35	0,0398
RNA5SP20	ENST00000515976	5,36	5,65	5,95	5,96	6,05	6,26	1,35	0,0365
GMFG	NM_004877	6,58	5,86	6,50	7,06	6,29	6,91	1,36	0,0024
RNF5P1	NR_003129	5,57	5,40	5,52	6,02	5,82	5,98	1,36	0,0006
CLYBL	AK095506	5,24	5,28	5,04	5,63	5,61	5,66	1,36	0,0365
OTTHUMG0000074314	OTTHUMT0000157906	7,41	7,61	7,82	7,93	8,08	8,18	1,36	0,0106
PPP2R3A	NM_002718	6,98	7,22	6,87	7,47	7,75	7,19	1,36	0,0211
C1QTNF1-AS1	NR_040018	5,27	5,49	5,50	5,69	5,81	6,11	1,36	0,0343
MYH15	NM_014981	5,14	6,00	6,08	5,80	6,33	6,44	1,37	0,0500
SGPL1	NM_003901	8,49	9,04	8,94	9,00	9,46	9,37	1,37	0,0040
KIF5C	NM_004522	7,16	7,52	7,52	7,76	7,84	7,97	1,37	0,0302
EPB41L4A	ENST00000261486	5,56	5,34	5,88	6,12	5,93	6,16	1,39	0,0414
YPEL3	NM_031477	7,54	7,17	7,58	8,14	7,73	7,86	1,39	0,0414
FAM178B	ENST00000417561	6,53	6,89	6,38	7,22	7,25	6,76	1,40	0,0454
OTTHUMG0000159250	OTTHUMT0000354086	4,79	5,08	5,69	5,34	5,64	6,04	1,40	0,0187
GPR15	NM_005290	9,37	9,61	10,03	9,97	10,07	10,43	1,40	0,0152
TLR7	NM_016562	6,98	7,34	7,32	7,49	7,89	7,73	1,40	0,0059
TWF1	NR_073472	9,82	9,65	9,69	10,34	10,04	10,27	1,41	0,0131
SBDSP1	NR_024110	5,85	5,55	5,68	6,28	6,14	6,13	1,41	0,0106
ANXA8	NM_001271702	7,11	8,17	8,10	7,68	8,66	8,55	1,41	0,0047
ERLIN1	NM_006459	8,75	9,08	8,90	9,39	9,57	9,28	1,42	0,0218
XIRP1	NM_194293	6,27	7,08	6,86	6,64	7,66	7,45	1,43	0,0183
SH3RF1	NM_020870	7,89	7,96	8,17	8,41	8,52	8,64	1,43	0,0026
HIST1H2BH	NM_003524	6,89	7,69	6,92	7,61	8,12	7,33	1,43	0,0344
IRF1	NM_002198	9,12	8,45	9,01	9,72	8,99	9,44	1,44	0,0093
SLFN5	NM_144975	8,00	7,73	8,84	8,52	8,16	9,51	1,46	0,0172
HGSNAT	NM_152419	6,41	6,59	7,29	6,98	7,03	7,96	1,47	0,0142

ADAM20P1	NR_037933	5,62	5,02	5,49	6,37	5,59	5,87	1,48	0,0347
ANXA8L1	NM_001098845	6,92	8,08	7,98	7,53	8,59	8,59	1,49	0,0030
ZNRF2P1	NR_003502	6,13	5,66	6,80	6,87	6,33	7,19	1,51	0,0290
ZFHX3	ENST00000397992	8,46	8,80	8,49	9,19	9,38	8,98	1,52	0,0137
LINC00636	NR_015394	5,96	6,88	6,01	6,62	7,47	6,59	1,52	0,0016
ALOX15	NM_001140	5,00	4,79	5,10	5,63	5,39	5,70	1,53	0,0003
GTF2IRD2	NM_173537	4,92	4,06	5,17	5,61	4,69	5,73	1,54	0,0034
OTTHUMG0000015096	OTTHUMT0000041327	3,90	5,40	4,59	4,57	5,94	5,33	1,57	0,0079
LOC100996357	XR_171564	5,28	5,39	5,53	5,80	6,16	6,20	1,58	0,0112
SLAMF1	ENST00000302035	6,41	5,85	6,53	7,02	6,62	7,19	1,60	0,0052
PTP4A3	ENST00000329397	8,90	8,71	8,88	9,66	9,54	9,36	1,62	0,0231
SNORA31	NR_002967	4,83	3,49	5,40	5,67	4,44	5,83	1,67	0,0441
SMAD4	ENST00000452201	5,10	5,25	5,27	6,08	6,04	5,80	1,69	0,0284

7.2 Danksagung

Prof. Dr. Ralf Küppers gilt mein besonderer Dank, da er mir die Möglichkeit gegeben hat dieses intensive und lehrreiche Projekt bearbeiten zu dürfen und er mir während der gesamten Zeit stets mit wertvollen Ratschlägen und Hilfestellungen zur Seite stand. Besonders Dank gilt auch Dr. Marc Weniger, der mir sämtliche Methoden beibrachte, Ansprechpartner während meiner Doktorarbeit war und auch bei komplexeren Problemstellungen immer eine mögliche Herangehensweise wusste.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Küppers danken, die bei Fragen stets hilfsbereit zur Seite standen. Kerstin Heise half mir bei den Immunglobulin Analysen und Dr. Markus Schneider stand als Ansprechpartner bei Fragen rund um die Exom-Sequenzierung und Mikrodisektion immer zur Verfügung. Ohne Klaus Lennartz wäre das Sortieren der Zellen kaum möglich gewesen. Ihm danke ich sehr für seine Hilfe.

Für die gute Kooperation und Bereitstellung der Tonsillen bedanke ich mich bei Dr. Judith Arnolds und Prof. Dr. Stephan Lang von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Essen.

Ein besonderes Dankeschön gilt unseren Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martin-Leo Hansmann vom Senckenbergischen Institut für Pathologie an der Universitätsklinik Frankfurt am Main für die Bereitstellung von primären Material und der Anfertigung von Immunhistochemischen Färbungen.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Barbara Sitek, besonders Dr. Thilo Bracht, vom Medizinischen Proteom-Zentrum der Ruhr-Universität Bochum für die massenspektrometrische Analyse und Auswertung bedanken.

Meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden möchte ich auch in besonderem Maße danken, die auch in schwierigen Zeiten für mich da sind und mir Rückhalt und Unterstützung geben.

7.3 Publikationsliste

Lollies, A., Hartmann, S., Schneider, M., Bracht, T., Weiss, A.L, Arnolds, J., Klein-Hitpass, L., Sitek, B., Hansmann, M.L., Küppers, R., Weniger, M.A. (2017). An oncogenic axis of STAT mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. Leukemia, doi: 10.1038/leu.2017.203.

Hartmann, S., Schuhmacher, B., Rausch, T., Fuller, L., Döring, C., Weniger, M.A., **Lollies, A.**, Weiser, C., Thurner, L., Rengstl, B., Brunnberg, U., Vornanen, M., Pfreundschuh, M., Benes, V., Küppers, R., Newrzela, S., Hansmann, M.L. (2016). Highly recurrent mutations of SGK1, DUSP2 and JUNB in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. Leukemia, 30(4): 844-53.

Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., **Lollies, A.**, Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B., Küppers, R. (2015). Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. Proc Natl Acad Sci U S A, 112 (6): E546-E555.

Vogel, C.F., Wu, D., Goth, S.R., Baek, J., **Lollies, A.**, Domhardt, R., Grindel, A., Pessah, I. (2013). Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF- κ B RelB activation during dendritic cell differentiation. Immunol Cell Biol, 91(9): 568–75.

Vogel, C. F., Garcia, J., Wu, D., Mitchell, D. C., Zhang, Y., Kado, N. Y., Wong, P., Trujillo, D.A., **Lollies, A.**, Bennet, D., Schenker, M.B., Mitloehner, F. M. (2012). Activation of inflammatory responses in human U937 macrophages by particulate matter collected from dairy farms: an in vitro expression analysis of pro-inflammatory markers. Environmental Health, 11, 17.

7.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle des AP-1-Transkriptionsfaktors BATF3 in CD30⁺-Lymphomen und die genetische Charakterisierung von Kombinationslymphomen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anna Lollies befürworte.

Essen, den _____
Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Anna Lollies

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung d es Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Anna Lollies